



Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Generación y caracterización de anticuerpos
frente al receptor de quimioquinas CCR9
humano. Evaluación de su potencial para
inmunoterapia antitumoral

María Vela Cuenca

Madrid, junio 2015

Memoria presentada por
María Vela Cuenca
para optar al grado de Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora: Dra. Leonor Kremer Barón
Co-Directora: Dra. Sonia Chamorro Pérez

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Dra. L. Kremer, en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), en el marco de Proyectos de Investigación en Salud del ISCIII (Ref. PI10/00594 y PI14/00703) financiados con fondos FEDER y del PN de I+D+I y siendo Investigador Principal LK. Los contratos de María Vela Cuenca se financiaron con fondos de dos Proyectos Intramurales del CSIC, dirigidos por LK (Ref. 201120E007 y 201320E109).

Índice



I. Abreviaturas	1
II. Resumen	7
III. Summary	9
IV. Introducción	11
1 Terapia antitumoral basada en anticuerpos.....	11
1.1 <i>Uso de anticuerpos monoclonales en inmunoterapia antitumoral.....</i>	11
1.2 <i>Características estructurales y funcionales de los anticuerpos.....</i>	13
1.3 <i>Mecanismos de acción de los mAb como agentes terapéuticos antitumorales.....</i>	15
1.3.1 <i>Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).....</i>	15
1.3.2 <i>Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).....</i>	16
1.3.3 <i>Bloqueo de la unión del ligando a sus receptores en las células tumorales.....</i>	18
1.3.4 <i>Inhibición de la angiogénesis tumoral.....</i>	19
1.3.5 <i>Activación de las células T del sistema inmune.....</i>	19
1.3.6 <i>Transporte dirigido de agentes citotóxicos.....</i>	19
2. Receptores de quimioquinas como diana para el tratamiento del cáncer.....	20
2.1 <i>Las quimioquinas y sus receptores.....</i>	20
2.1.1 <i>Estructura y clasificación de las quimioquinas y sus receptores.....</i>	20
2.1.2 <i>Señalización intracelular de los receptores de quimioquinas.....</i>	21
2.2 <i>Receptores de quimioquinas en cáncer.....</i>	23
2.3 <i>mAb frente a receptores de quimioquinas para el tratamiento del cáncer.....</i>	24
2.4 <i>El receptor de quimioquinas CCR9.....</i>	26
2.5 <i>CCR9 como diana terapéutica para el tratamiento del cáncer.....</i>	28
V. Objetivos	31

VI. Materiales y métodos	33
1 Cultivo celular.....	33
2 Generación de anticuerpos	33
2.1 Inmunización de ratones BALB/c.....	33
2.2 Fusión celular.....	34
2.3 Selección de hibridomas y estabilización por dilución límite.....	34
2.4 Purificación de mAb.....	34
2.5 Determinación de isotipo y biotinilación de mAb.....	35
3. Silenciamiento génico.....	35
4. Citometría de flujo	36
4.1 Tinción de células en cultivo.....	36
4.2 Tinción de muestras de sangre o médula ósea.....	36
5. Ensayo de movilización de calcio intracelular.....	37
6. Ensayo de migración celular.....	37
7. Enzimoinmunoensayo (ELISA).....	37
8. Electroforesis en gel de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunodetección.....	38
9. Resonancia de plasmón de superficie (SPR).....	38
10. Análisis Pepscan.....	39
11. Secuenciación de las regiones variables de anticuerpos.....	39
11.1 Aislamiento de RNA, RT-PCR y amplificación.....	39
11.2 Clonaje de fragmentos de PCR y obtención de plásmidos de colonia aislada.....	40
11.3 Análisis de secuencias.....	40
11.4 Confirmación de las secuencias de aminoácidos mediante técnicas de proteómica	41
12. Modelado estructural y de interacciones péptido-anticuerpo.....	41
13. Ensayos xenogénicos.....	41
14. Histología.....	42

14.1 Hematoxilina-eosina.....	42
14.2 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick end labelling).....	43
14.3 Tinción de PCNA	43
14.4 Tinción de CD31.....	43
14.5 Análisis de las imágenes.....	43
15. Citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC).....	44
16. Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).....	44
17. PCR cuantitativa.....	44
17.1 Muestras.....	44
17.2 Extracción de RNA.....	45
17.3 RT-qPCR.....	45
18. Anticuerpos primarios.....	46
19. Anticuerpos control isotópico.....	47
20. Anticuerpos secundarios.....	47
21. Análisis estadístico.....	47

VII. Resultados 49

1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente al receptor de quimioquinas humano CCR9.....	49
1.1 Generación de mAb frente al receptor de quimioquinas hCCR9.....	49
1.2 Estudio de la especificidad de los mAb anti hCCR9.....	51
1.3 Análisis de la unión del mAb 91R a CCR9 en la presencia de CCL25 y del efecto de 91R sobre la migración celular inducida por CCL25.....	54
1.4 Competición de los mAb 91R y 92R por su unión a un epítipo presente en el dominio amino terminal de hCCR9.....	55
1.5 Análisis de las constantes cinéticas y de afinidad de la interacción de los mAb 91R y 92R con un péptido correspondiente a los aa 2-22 de hCCR9-A.....	57

1.6 Identificación mediante un panel de péptidos del epítipo mínimo reconocido por los mAb 91R y 92R en la secuencia primaria de hCCR9.....	59
1.7 Caracterización de los aa de hCCR9 relevantes para la interacción entre los mAb 91R y 92R y el receptor.....	60
1.8 Secuenciación de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los mAb 91R y 92R.....	63
1.9 Modelo de interacción molecular entre un péptido correspondiente a las posiciones de aa 10-18 de hCCR9-A y las regiones variables del mAb 91R.....	66
2. Evaluación de la actividad antitumoral de 91R y 92R frente a células de leucemia humana CCR9⁺.....	69
2.1 Citotoxicidad celular dependiente de células NK mediada por los mAb 91R y 92R en células MOLT-4.....	69
2.2 Citotoxicidad dependiente de complemento mediada por los mAb 91R y 92R en células MOLT-4.....	70
2.3 Análisis del crecimiento de tumores xenogénicos en ratones iniciando el tratamiento con el mAb 91R o 92R al día siguiente de la inoculación de las células tumorales.....	71
2.4 Análisis del crecimiento de tumores xenogénicos en ratones iniciando el tratamiento con el mAb 91R una semana después de la inoculación de las células tumorales	73
2.5 Cinética de inhibición del crecimiento temprano de tumores xenogénicos en ratones tratados con el mAb 91R.....	75
2.6 Análisis histológico de los tumores xenogénicos de MOLT-4 procedentes de ratones tratados con 91R.....	76
3. Análisis de la expresión de CCR9 en muestras de tumores humanos de diferentes orígenes.....	78
3.1 Estudio de la expresión de CCR9 en tumores humanos ginecológicos, de colon y melanomas.....	78
3.2 Estudio de la expresión de CCR9 en neoplasias hematológicas humanas.....	85
VIII. Discusión	89
1. Generación de mAb específicos frente a hCCR9	89
2. Reconocimiento del dominio N-terminal de hCCR9 por los mAb 91R y 92R.....	90
3. Comparación de la secuencia y afinidad por hCCR9 de los mAb 91R y 92R.....	92

4. Modelado estructural de 91R y de sus interacciones con hCCR9.....	93
5. Actividad antitumoral y mecanismos de acción de 91R y 92R.....	94
6. Expresión de CCR9 en tumores humanos.....	96
7. Aplicaciones terapéuticas de los mAb anti CCR9.....	98

IX. Conclusiones	101
-------------------------	------------

X. Bibliografía	103
------------------------	------------

XI. Anexo	117
------------------	------------

Publicaciones y patentes	
---------------------------------	--

Abreviaturas



7-AAD	7-actinomicina D
A	Adenina
A	Alanina
aa	Aminoácido
Ab	Anticuerpo
ACKR	Receptor de quimioquina atípico (del inglés, <i>atypical chemokine receptor</i>)
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (del inglés, <i>antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i>)
Ag	Antígeno
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Ala	Alanina
APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann solver</i>
APC	Aloficocianina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Biot	Biotina
BRC	Complemento de conejo (del inglés, <i>baby rabbit complement</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
C	Cisteína
CAM	Complejo de ataque a la membrana
CCL	Ligando de quimioquina con motivo C-C (del inglés, <i>chemokine (C-C motif) ligand</i>)
CCR	Receptor de quimioquina con motivo C-C (del inglés, <i>chemokine (C-C motif) receptor</i>)
CD	Sistema de diferenciación (del inglés, <i>cluster of differentiation</i>)
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento (del inglés, <i>complement dependent cytotoxicity</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés, <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CDR	Región determinante de la complementariedad (del inglés, <i>Complementary determining region</i>)
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester
CH	Región constante de la cadena pesada (del inglés, <i>constant region of the heavy chain</i>)
CL	Región constante de la cadena ligera (del inglés, <i>constant region of the light chain</i>)
CLA	Antígeno de linfocito cutáneo (del inglés, <i>cutaneous lymphocyte antigen</i>)
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (del inglés, <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
CX3CL	Quimioquina con motivo C-X3-C (del inglés, <i>chemokine (C-X3-C motif) ligand</i>)
CX3CR	Receptor de quimioquina con motivo C-X3-C (del inglés, <i>chemokine (C-X3-C motif) receptor</i>)
CXCL	Quimioquina con motivo C-X-C (del inglés, <i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>)

Abreviaturas

CXCR	Receptor de quimioquina con motivo C-X-C (del inglés, <i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>)
Cy	Cianina
Cys	Cisteína
D	Ácido aspártico
DAG	D-1,2-diacilglicerol
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida
DMEM	Medio de Dulbecco modificado por Eagle (del inglés, <i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato (del inglés, <i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
dUTP	Desoxiuridina trifosfato (del inglés, <i>deoxyuridine triphosphate</i>)
E	Ácido glutámico
EC	Extracelular
ECL	Sustrato quimioluminiscente mejorado basado en luminol (del inglés, <i>enhanced luminol-based chemiluminescent substrate</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada (del inglés, <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Erk	Quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés, <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>)
F	Fenilalanina
Fab	Fragmento de unión a antígeno (del inglés, <i>fragment antigen-binding</i>)
FACS	Separación de células activada por fluorescencia (del inglés, <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FAK	Quinasa de adhesión focal (del inglés, <i>focal adhesion kinase</i>)
FBS	Suero fetal de bovino (del inglés, <i>fetal bovine serum</i>)
Fc	Fragmento cristizable
FC	Celda de flujo (del inglés, <i>flow cell</i>)
FC	Citometría de flujo
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés, <i>fluorescein 5-isothiocyanate</i>)
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
FR	Región marco (del inglés, <i>framework region</i>)
G	Guanina
G	Glicina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosina difosfato
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (del inglés, <i>G protein coupled receptor</i>)

GRK	Quinasa del receptor acoplado a proteína G (del inglés, <i>G protein coupled receptor kinase</i>)
GTP	Guanosina trifosfato
H	Histidina
HACA	Anticuerpos humanos anti anticuerpos quiméricos (del inglés, <i>human anti-chimeric antibodies</i>)
HAHA	Anticuerpos humanos anti anticuerpos humanizados (del inglés, <i>human anti-humanized antibodies</i>)
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
HER	Receptor humano del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>human epidermal growth factor receptor</i>)
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
His	Histidina
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés, <i>horseradish peroxidase</i>)
I	Isoleucina
Ig	Inmunoglobulina
IHC	Inmunohistoquímica
IL-2	Interleuquina 2
Ile	Isoleucina
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
JAK	Quinasa Janus (del inglés, <i>Janus kinase</i>)
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal (del inglés, <i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
K	Lisina
k _a	Constante cinética de asociación
k _d	Constante cinética de disociación
K _D	Constante de afinidad al equilibrio
L	Leucina
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucina
Lys	Lisina
M	Metionina
mAb	Anticuerpo monoclonal (del inglés, <i>monoclonal antibody</i>)
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz (del inglés, <i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight</i>)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
Met	Metionina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, <i>major histocompatibility complex</i>)
MMAE	Monometil auristatina E
MO	Médula ósea
MOLT-4-luc	Células MOLT-4 bioluminiscentes
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (del inglés, <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	Espectrometría de masas (del inglés, <i>mass spectrometry</i>)
N	Asparagina
NHS	N-hidroxisuccinimida
NK	Célula asesina natural (del inglés, <i>natural killer</i>)

Abreviaturas

O.C.T.	Medio de montaje para cortes criopreservados (del inglés, <i>optimal cutting temperature compound</i>)
OPD	O-fenilendiamina
P	Prolina
P20	Polisorbato 20
PB	Azul pacífico (del inglés, <i>Pacific blue</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés, <i>phosphate buffer saline</i>)
PBSst	Tampón fosfato salino para la tinción de células
PCNA	Antígeno de proliferación nuclear (del inglés, <i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	Proteína 1 de muerte celular programada (del inglés, <i>programmed cell death protein 1</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	Ficoeritrina
PEG	Polietilenglicol
PerCP	Proteína clorofila peridinina
Phe	Fenilalanina
pI	Punto isoelectrico
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinasa C (del inglés, <i>protein kinase C</i>)
PLC	Fosfolipasa C
Pro	Prolina
Pyk	Tirosina quinasa rica en prolinas (del inglés, <i>Prolin-rich tyrosine kinase</i>)
Q	Glutamina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
R	Arginina
Rag2	Gen activador de la recombinación 2 (del inglés, <i>Recombination activating gene 2</i>)
RMSD	Raíz cuadrada de la desviación media (del inglés, <i>Root mean square deviation</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Temperatura ambiente (del inglés, <i>Room temperature</i>)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, con transcriptasa inversa (del inglés, <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RU	Unidad de resonancia (del inglés, <i>resonance unit</i>)
S	Serina
s.c.	Subcutáneo
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla (del inglés, <i>single chain variable fragment</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (del inglés, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Error estándar de la media (del inglés, <i>standard error of the mean</i>)

Ser	Serina
shRNA	Ácido ribonucleico con forma de horquilla corta (del inglés, <i>short hairpin ribonucleic acid</i>)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida
SP	Sangre periférica
SPR	Resonancia de plasmón de superficie (del inglés, <i>surface plasmon resonance</i>)
STAT	Proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción (del inglés, <i>signal transducer and activator of transcription protein</i>)
T	Timina
T	Treonina
TBS	Tampón Tris salino
TECK	Quimioquina expresada en el timo (del inglés, <i>thymus expressed chemokine</i>)
Th	Célula T cooperadora (del inglés, <i>T helper cell</i>)
Thr	Treonina
TK	Timidina quinasa (del inglés, <i>thymidine kinase</i>)
TM	Transmembrana
TNM	Sistema de estadiaje tumor-nódulo-metástasis
TRC	<i>The RNAi Consortium</i>
Treg	Célula T reguladora (del inglés, <i>regulatory T cell</i>)
Trp	Triptófano
TUNEL	Marcaje con dUTP en los extremos libres mediante la transferasa terminal de desoxinucleótidos, del inglés, <i>terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labelling</i>
Tyr	Tirosina
u.a.	Unidades arbitrarias
ufp	Unidades formadoras de placa
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
V	Valina
Val	Valina
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
VEGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>)
VH	Región variable de la cadena pesada (del inglés, <i>variable domain of the heavy chain</i>)
VL	Región variable de la cadena ligera (del inglés, <i>variable domain of the light chain</i>)
VLA-4	Antígeno tardío 4 (del inglés, <i>very late antigen 4</i>) o integrina $\alpha 4 \beta 1$
W	Triptófano
XCL	Quimioquina con motivo X-C (del inglés, <i>chemokine (X-C motif) ligand</i>)
XCR	Receptor de quimioquina con motivo X-C (del inglés, <i>chemokine (X-C motif) receptor</i>)
Y	Tirosina

Resumen



El uso de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento del cáncer ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años, al permitir el desarrollo de tratamientos muy específicos y de baja toxicidad. Muchos de estos anticuerpos reconocen antígenos presentes de forma selectiva en la superficie de las células tumorales. Este es el caso del receptor de quimioquinas CCR9, implicado en la retención en el timo de las células T en desarrollo y en el reclutamiento de leucocitos al intestino delgado, donde se expresa su ligando, la quimioquina CCL25. En adultos, tras la involución del timo, la expresión de CCR9 es muy limitada, reduciéndose a células del sistema inmune que infiltran la mucosa intestinal y a un 3-4% de los leucocitos circulantes. Se ha descrito la expresión de este receptor en distintos tipos de neoplasias, incluyendo leucemias linfocíticas agudas de células T, metástasis de melanomas, cáncer de mama y adenomas de colon. Por estos motivos, se considera a CCR9 como una diana atractiva para el diseño de nuevos agentes terapéuticos antitumorales.

En este trabajo se describe la generación y caracterización de dos anticuerpos monoclonales (mAb) específicos de CCR9 humano, denominados 91R y 92R, obtenidos mediante inmunización génica. Estos mAb reconocen al receptor en su conformación nativa y se unen a un mismo epítipo, presente en el dominio N-terminal extracelular de CCR9 entre sus aminoácidos 11 y 16 (aa 11-16). 91R y 92R se unen con alta afinidad (K_D entre 1 y 2 nM) a un péptido sintético que contiene dicho epítipo. Los dos mAb podrían estar relacionados en su origen, ya que presentan una elevada identidad de secuencia de aa de sus regiones variables, del 95% en las cadenas pesadas y del 89% en las ligeras. Disponer de estas secuencias de aa ha permitido la modelización bioinformática de la estructura del complejo 91R-CCR9 y la identificación de los aa más implicados en esta interacción. La información extraída de estos modelos ha sido confirmada experimentalmente, utilizando un panel de péptidos sintéticos, observándose que los aa Asn12 y Asp16 del epítipo CCR9(11-16) son imprescindibles para que se produzca la interacción antígeno-mAb.

Los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demostraron que los mAb 91R y 92R presentan una potente actividad antitumoral frente a células CCR9⁺. Los dos mAb son capaces de promover la lisis, mediada por el complemento y por células citotóxicas, de células MOLT-4 de leucemia linfocítica aguda de células T. En modelos xenogénicos de ratones BALB/c Rag2^{-/-}, estos mAb inhiben eficazmente el crecimiento de tumores subcutáneos de células MOLT-4. Cuando el tratamiento con mAb se inicia al día siguiente de la inoculación de las células tumorales, los mAb 91R y 92R reducen el crecimiento de los tumores en un 91% y en un 100%, respectivamente. Además, 91R es capaz de inhibir en un 64% el tamaño de los tumores cuando se administra 7 días después de la inoculación tumoral, y en un 85% cuando el número de dosis de mAb se reduce a la mitad. Se ha observado que la disminución del tamaño de los tumores en los ratones tratados con 91R se correlaciona con un aumento en el nivel de necrosis y de apoptosis, y con una disminución del número de células proliferantes y de la angiogénesis intratumoral.

Finalmente, se ha analizado la expresión de CCR9 en muestras de tumores humanos de diferentes orígenes. Se ha observado la expresión de CCR9 en algunas neoplasias hematológicas de células B, lo que permite incluir a este tipo de patologías entre las que podrían beneficiarse de un tratamiento con agentes dirigidos frente a CCR9. En resumen, los mAb descritos en este trabajo presentan elevado potencial como agentes terapéuticos contra el cáncer.

Summary



The use of therapeutic antibodies for the treatment of cancer has grown exponentially in recent years since they combine high specificity and low toxicity. Many of these antibodies recognize antigens present selectively on the surface of tumor cells. This is the case of chemokine receptor CCR9. This receptor is involved in the retention of developing T cells in the thymus and in the recruitment of leukocytes into the small intestine, where its ligand, the chemokine CCL25, is expressed. In adulthood, after thymus involution, CCR9 expression is very limited. It is restricted to infiltrating immune cells in the intestinal mucosa and 3-4% of circulating leukocytes. It has been described the expression of this receptor in various types of neoplasias, including T-cell acute lymphocytic leukemias, metastatic melanomas, breast cancer and colon adenomas. For these reasons, CCR9 is an attractive target for the design of new anti-tumor therapeutic drugs.

Here, we describe the generation and characterization of two monoclonal antibodies (mAb) specific to human CCR9, termed 91R and 92R, obtained by gene immunization. These mAb recognize the receptor in its native conformation and bind to a common epitope, present in the N-terminal extracellular domain of CCR9, amino-acids 11-16 (aa 11-16). 91R and 92R have high binding affinity to a synthetic peptide containing such epitope, with K_D between 1 and 2 nM. Both mAb could be related in their origin, since they have high aa sequence identity of its variable regions, 95% for its heavy chains and 89% for its light chains. These aa sequences allowed the bioinformatics structure modeling of CCR9-91R complex and the identification of the key aa responsible for this interaction. The information obtained from these models has been confirmed experimentally, using a panel of synthetic peptides, observing that Asp16 and Asn12 aa within CCR9(11-16) epitope are essential for the antigen-mAb interaction.

In vitro and *in vivo* studies showed a potent antitumor activity against CCR9⁺ cells of 91R and 92R mAb. Both mAb are able to promote complement mediated- and cytotoxic cells-mediated lysis of acute T-cell lymphocytic leukemia MOLT-4 cells. In BALB/c Rag2^{-/-} mice xenogeneic models these mAb effectively inhibited the subcutaneous growth of MOLT-4 cells tumors. When mAb treatment begins on day 1 after tumor cells inoculation, the mAb 91R and 92R reduce the growth of tumors by 91% and 100%, respectively. Moreover, 91R is able to inhibit by 64% the size of tumors when administered 7 days after tumor inoculation, and 85% when the number of mAb doses are halved. It has been observed that the reduced size of tumors in 91R-treated mice correlates with an increase in the level of intra-tumor necrosis and apoptosis, and decreased number of proliferating cells and angiogenesis.

Finally, we analyzed the expression of CCR9 in human tumor samples from different origins. CCR9 expression was found in certain B-cell hematological neoplasias allowing the inclusion of this type of pathologies among those that could benefit from treatments with agents directed against CCR9. In summary, the mAbs described in this study have high potential as therapeutic agents against cancer.

Introducción



1. Terapia antitumoral basada en anticuerpos

1.1 Uso de anticuerpos monoclonales en inmunoterapia antitumoral

Se han producido grandes avances en el tratamiento cáncer, sin embargo, no se dispone de tratamientos eficaces para todos sus tipos ni estadios, debido principalmente a su origen multifactorial y a su elevada complejidad. Actualmente se considera que en el futuro, la terapia contra el cáncer habrá de ser específica para cada tipo de tumor e incluso para cada paciente y que ésta se basará en la combinación de múltiples terapias con diferentes mecanismos de acción. La cirugía, la radiación y la quimioterapia son las herramientas tradicionales de la lucha contra el cáncer. Recientemente, a esta lista se han añadido inhibidores específicos, vacunas y el uso del propio sistema inmune del paciente para eliminar de forma selectiva las células malignas. Dentro de estas nuevas estrategias se encuentra la inmunoterapia antitumoral, una parte importante de la misma se basa en el uso de anticuerpos específicos. Durante la última década, se ha producido un crecimiento exponencial del uso de anticuerpos como agentes antineoplásicos para el tratamiento tanto de tumores sólidos como hematológicos (Scott et al., 2012).

La idea de emplear anticuerpos para atacar selectivamente los tumores data de hace más de un siglo, y tiene su origen en los postulados de Paul Ehrlich, padre de la inmunología como disciplina científica (Ehrlich, 1906). Durante años se dedicaron importantes esfuerzos a la inmunización de animales de diversas especies con células derivadas de tumores humanos, con el objetivo de generar antisueros con algún grado de especificidad frente al cáncer (Rettig and Old, 1989). En 1975, la introducción de la tecnología de hibridomas, permitió la producción de anticuerpos monoclonales (Kohler and Milstein, 1975). Esta tecnología consiste en la fusión de una célula B con una célula de mieloma murino para dar lugar a una célula híbrida denominada hibridoma. Ésta célula es capaz de producir un único tipo de anticuerpo y de dividirse de forma casi ilimitada. Debido a su origen murino, los mAb producidos resultan inmunogénicos y poseen escasa capacidad de inducir respuestas inmunes efectoras en humanos, lo que ha limitado enormemente su aplicación clínica. Posteriores avances en la ingeniería de anticuerpos han permitido el desarrollo de mAb quiméricos, humanizados y completamente humanos que han ayudado a solventado muchos de estos problemas.

La eficacia del uso de los mAb para el tratamiento de pacientes con cáncer ha sido ampliamente demostrada y varios mAb se emplean ya de forma rutinaria en la práctica clínica (**Tabla 1**). Muchos de estos anticuerpos reconocen específicamente antígenos expresados por el propio tumor. Este tipo de mAb, conjugados a radioisótopos o a fármacos citotóxicos, se utilizan principalmente para el tratamiento de neoplasias hematológicas (Hughes, 2010; Sievers et al., 1999; Witzig et al., 2002; Younes et al., 2010). Por otra parte, los mAb no conjugados, dirigidos principalmente frente a receptores de factores de crecimiento, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, también conocido como ErbB2/neu) se emplean de forma habitual para el tratamiento de tumores sólidos (Cunningham et al., 2004; Van Cutsem et al., 2009; Weiner et al., 2008). Asimismo, se utilizan mAb capaces de alterar el microambiente

tumoral, con el fin de dificultar el crecimiento del tumor, mediante la restricción de factores pro tumorales, la inhibición de la neovascularización (Hurwitz et al., 2004; Miller et al., 2007; Sandler et al., 2006), o la activación de la respuesta inmune del huésped frente a los antígenos tumorales (Blank, 2014; Kyi and Postow, 2014).

Tabla 1. mAb terapéuticos aprobados para su uso en oncología en la Unión Europea o los Estados Unidos

Anticuerpo	Diana	Indicación	Mecanismo de acción
<i>Anticuerpos simples: tumores sólidos</i>			
Trastuzumab (Herceptin); humanizado, IgG1	HER2	Cáncer de mama HER2 ⁺ ; carcinoma gástrico/gastroesofágico HER ⁺	Inhibición de la señalización de HER2; ADCC
Cetuximab (Erbix); quimérico, IgG1	EGFR	Cáncer colorrectal metastásico EGFR ⁺ ; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	Inhibición de la señalización de EGFR; ADCC
Bevacizumab (Avastin); humanizado, IgG1	VEGF	Cáncer de colon metastásico; cáncer de pulmón de células no pequeña; glioblastoma; cáncer cervical; cáncer de riñón metastásico	Inhibición de la señalización de VEGF
Panitumumab (Vectibix); humano, IgG2	EGFR	Cáncer colorrectal metastásico EGFR ⁺	Inhibición de la señalización de EGFR
Ipilimumab (Yervoy); humano, IgG1	CTLA-4	Melanoma metastásico o no quirúrgico	Inhibición de la señalización de CTLA-4
Pertuzumab (Perjeta); humanizado, IgG1	HER2	Cáncer de mama HER ⁺	Inhibición de la señalización de HER2; ADCC
Ramucirumab (Cyramza); humano, IgG1	VEGFR2	Cáncer gástrico	Inhibición de la señalización de VEGFR2
Pembrolizumab (Keytruda); humanizado, IgG4	PD-1	Melanoma metastásico o no quirúrgico; cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico	Inhibición de la señalización de PD-1
Nivolumab (Opdivo); humano, IgG4	PD-1	Melanoma metastásico o no quirúrgico; cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico	Inhibición de la señalización de PD-1
<i>Anticuerpos conjugados: tumores sólidos</i>			
Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla); humanizado, IgG1	HER2	Cáncer de mama HER2 ⁺	Inhibición de la señalización de HER2; ADCC; transporte dirigido del agente citotóxico emtansine
<i>Anticuerpos simples: tumores hematológicos</i>			
Rituximab (Mabthera); quimérico, IgG1	CD20	Leucemia linfocítica crónica CD20 ⁺ ; linfoma no-Hodgkin CD20 ⁺	ADCC; CDC; inducción directa de apoptosis
Alemtuzumab* (Campath); humanizado, IgG1	CD52	Leucemia linfocítica crónica	CDC; ADCC; inducción directa de apoptosis
Ofatumumab (Arzerra);	CD20	Leucemia linfocítica crónica	ADCC; CDC

humano, IgG1			
Obinutuzumab (Gazyva); humanizado, IgG1	CD20	Leucemia linfocítica crónica	ADCC; CDC; inducción directa de apoptosis
<i>Anticuerpos conjugados: tumores hematológicos</i>			
⁹⁰ Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin); murino, IgG1	CD20	Linfoma no-Hodgkin en recidiva o resistente a otros tratamientos	Transporte dirigido del radioisótopo ⁹⁰ Y
Brentuximab vedotin (Adcetris); quimérico, IgG1	CD30	Linfoma de Hodgkin; linfoma anaplásico de células grandes	Transporte dirigido de la toxina auristatina

* En 2012, Alemtuzumab (Campath) fue retirado del mercado por los fabricantes, tanto en Europa como en Estados Unidos, con el fin de reservar su patente para su aplicación en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Fuente: Scott et al., 2012; Food and Drug Administration (FDA); and The Antibody Society (www.antibodysociety.org).

1.2 Características estructurales y funcionales de los anticuerpos

Los anticuerpos poseen una estructura básica simétrica formada por 2 cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (cadenas H), unidas entre sí por puentes disulfuro; y 2 cadenas ligeras (cadenas L), igualmente idénticas entre sí, cada una de ellas unida a una cadena pesada por interacciones covalentes y no covalentes (**Fig. 1**). Las cadenas ligeras tienen una porción variable (VL), de la que depende la especificidad, y una región constante (CL) que es diferente dependiendo del tipo de cadena ligera, κ o λ . Asimismo, las cadenas pesadas constan de una región variable (VH) y una constante (CH). Esta última determina la clase o el isotipo principal de la inmunoglobulina: μ , δ , γ , α o ϵ , que formarán los anticuerpos denominados IgM, IgD, IgG, IgA, o IgE, respectivamente. De las cinco clases de anticuerpos, la IgG, debido a su tamaño y a sus características funcionales, es la más utilizada en la inmunoterapia del cáncer (Álvarez-Vallina, 2004). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras están yuxtapuestas en la molécula de inmunoglobulina, formando el sitio de unión al antígeno, de tal forma que cada molécula de anticuerpo tiene 2 sitios de unión a su antígeno.

Los anticuerpos constan de dos unidades funcionales distintas, el fragmento de unión al antígeno (Fab) y el fragmento cristizable (Fc). El Fab contiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, que incluyen tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) por cadena. Éstas son zonas hipervariables y dan lugar a la estructura a través de la cual un anticuerpo se une a su antígeno. El fragmento Fc está implicado en las funciones efectoras inmunes, es capaz de iniciar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y de unirse a receptores Fc γ de las células efectoras inmunes, desencadenando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

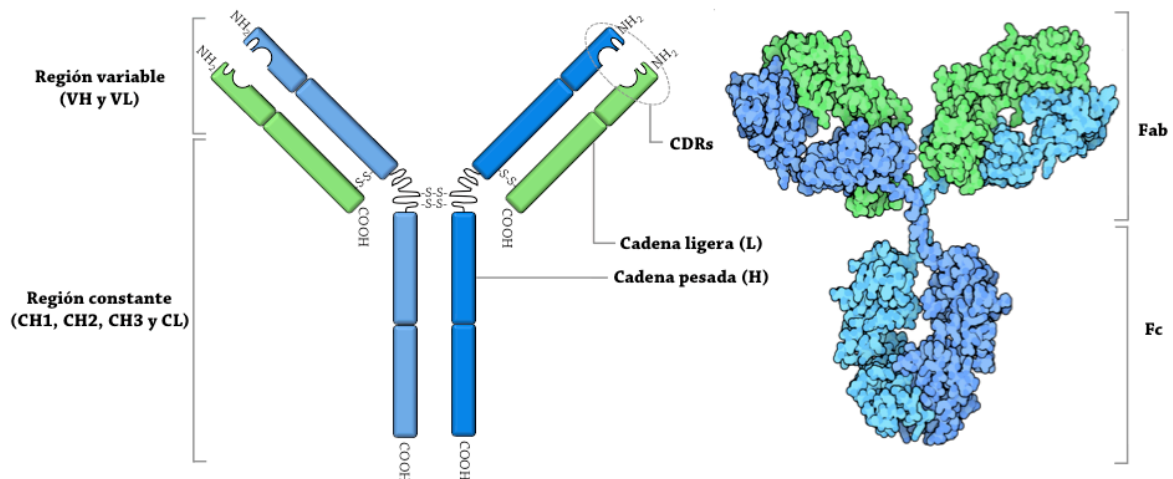


Figura 1. Esquema de la estructura de una molécula de inmunoglobulina (Ig).

A la izquierda, se muestra la representación esquemática de las cuatro cadenas polipeptídicas que conforman una molécula de Ig, con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras; así como la composición de las regiones variable y pesada de una Ig. A la derecha, se muestra una imagen de la estructura tridimensional de una molécula de Ig. Las cadenas pesadas se representan en color azul y las ligeras en verde.

VH (región variable de la cadena pesada de Ig); VL (región variable de la cadena ligera de Ig); CH (región constante de la cadena pesada de Ig); CL (región constante de la cadena ligera de Ig); CDR (Región determinante de la complementariedad; del inglés, complementary determining region); Fab (fragmento de unión al antígeno); Fc (fragmento cristalizante).

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que las regiones variables provienen de una Ig de ratón y las regiones constantes de una Ig humana. Los objetivos fundamentales de la quimerización son reducir la inmunogenicidad y potenciar las funciones efectoras de la molécula, manteniendo la especificidad y la afinidad del mAb original (Carter, 2001). La técnica de quimerización implica el aislamiento de los genes de las regiones VH y VL de un mAb a partir del hibridoma que lo produce; su inserción en vectores de expresión que contienen genes de las regiones CH o CL humana; y su transfección en células de mamífero para la producción y posterior purificación del anticuerpo (Glassy, 1993). Varios mAb aprobados actualmente para su uso clínico se han obtenido de esta forma, incluyendo cetuximab y rituximab.

La administración de anticuerpos quiméricos a seres humanos, no obstante, puede inducir respuestas de anticuerpos anti Ig quiméricas (HACA, *human anti-chimeric antibodies*) (Tan et al., 2002). Esta inmunogenicidad se debe al reconocimiento de epítomos situados en los dominios V murinos. Para reducir su inmunogenicidad, se desarrollaron las moléculas de Ig humanizadas. Esta tecnología consiste en el trasplante de las regiones hipervariables de un mAb murino entre las regiones marco de un dominio V humano (CDR *grafting*). De este modo, se genera un dominio V híbrido ratón-humano y se transfiere una determinada especificidad de reconocimiento de un anticuerpo de ratón a una molécula que es prácticamente

humana en la mayor parte de su secuencia. Ejemplos de mAb terapéuticos humanizados son trastuzumab, bevacizumab y alemtuzumab.

Se ha observado que algunas moléculas de Ig humanizadas presentan cierto grado de inmunogenicidad residual, que podría ser debida a los epítomos presentes en el parátipo, el lugar específico de unión del anticuerpo al epítomo de su antígeno correspondiente. En este caso se generan respuestas de anticuerpos anti Ig humanizadas (HAHA, *human anti-humanized antibodies*). Además, la inserción de las CDR murinas en el contexto de las regiones marco humanas puede dar lugar a una disminución en la afinidad de la interacción Ab-Ag. (Winter and Harris, 1993). Para eliminar estos inconvenientes, se han desarrollado mAb terapéuticos completamente humanos empleando ratones cuyos genes de Ig murinos se han reemplazados por genes de Ig humanos (Green, 1999; Lonberg et al., 1994). Mediante la inmunización de este tipo de ratones humanizados es posible generar mAb para uso terapéutico completamente humanos, como son panitimumab, ipilimumab y ofatumumab.

1.3 Mecanismos de acción de los anticuerpos como agentes antitumorales

Los principales mecanismos de eliminación de células tumorales por mAb se describen en la **figura 2**. Los mAb pueden mediar la muerte celular de forma directa, independiente del sistema inmune del paciente, o de forma indirecta, modulando la respuesta inmune. Las acciones directas incluyen el bloqueo de la señalización mediada por un receptor diana; la inducción de apoptosis; y el transporte dirigido de un fármaco o agente citotóxico. Las acciones indirectas incluyen CDC, ADCC y regulación de la activación de las células T. Además, los mAb pueden dar lugar a cambios en la vascularización del tumor o en su estroma, afectando a la progresión tumoral. Todos estos mecanismos son empleados por mAb que se aplican actualmente en la práctica clínica. No obstante, los diferentes mecanismos de acción no son independientes unos de otros. La mayor parte de los mAb ejercen sus acciones a través de la combinación de estos mecanismos de acción de forma simultánea (Scott et al., 2012).

1.3.1 Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC)

Este mecanismo provoca la destrucción de las células tumorales que están recubiertas por mAb, a través de las células del sistema inmune como las células NK, los macrófagos o los neutrófilos. La ADCC se produce cuando la porción Fab del mAb se une al antígeno sobre la célula tumoral y su porción Fc se une a un receptor FcγR activador de la célula inmune efectora. De este modo, el mAb actúa como puente entre la célula tumoral y la célula del sistema inmune. La activación de los FcγR de la célula efectora da lugar a un ataque citolítico sobre la célula diana (**Fig. 2A**). Tras la lisis de las células tumorales, las células presentadoras de antígeno pueden presentar péptidos derivados del tumor en moléculas de MHC de clase II y activar a las células T CD4⁺. Además, mediante presentación cruzada, los péptidos derivados del tumor pueden ser presentados en moléculas MHC de clase I, activando también las células T citotóxicas CD8⁺.

Los principales receptores Fcγ estimuladores de la actividad efectora son FcγRI (también conocido como CD64), expresado en macrófagos, células dendríticas,

neutrófilos y eosinófilos; y FcγRIIIA (también conocido como CD16A), expresado en células NK, células dendríticas, macrófagos y mastocitos. FcγRIIIA es necesario para la ADCC llevada a cabo por las células NK (Nimmerjahn and Ravetch, 2006).

Varios estudios han demostrado la importancia de las interacciones con los FcγR para los efectos antitumorales *in vivo* de diferentes mAb en modelos murinos y en ensayos clínicos. Por ejemplo, en ratones con deficiencia en FcγR, se ha observado una reducción en la actividad antitumoral de trastuzumab y rituximab respecto a la observada en ratones de tipo salvaje (Clynes et al., 2000). El papel de los FcγR en la respuesta antitumoral también se ha descrito en trabajos en los que se analizó cómo diferentes polimorfismos de los genes que codifican FcγR dan lugar a tasas diferenciales de respuesta a los mAb terapéuticos (Bibeau et al., 2009; Cartron et al., 2002; Musolino et al., 2008; Weng and Levy, 2003). Como consecuencia, se han desarrollado múltiples esfuerzos en la modificación de la estructura primaria de los dominio Fc de mAb para aumentar su afinidad por FcγR y mejorar su capacidad de inducir ADCC (Horton et al., 2008; Rech and Vonderheide, 2009; Zalevsky et al., 2009). Otro modo de incrementar la respuesta ADCC es la modificación del contenido oligosacárido del dominio Fc de los mAb terapéuticos. La mayoría de los mAb terapéuticos actualmente utilizados presentan un alto grado de fucosilación por la naturaleza de las líneas celulares empleadas en su producción. Sin embargo, los anticuerpos defucosilados han demostrado una mejora significativa en su capacidad de inducir ADCC *in vitro* y mejorar su actividad antitumoral *in vivo* (Kubota et al., 2009). Es el caso de mogamulizumab, un mAb humanizado, defucosilado, específico del receptor de quimioquinas CCR4, que mantiene la eficacia a dosis significativamente más bajas que las de los mAb terapéuticos convencionales (Kubota et al., 2009).

1.3.2 Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)

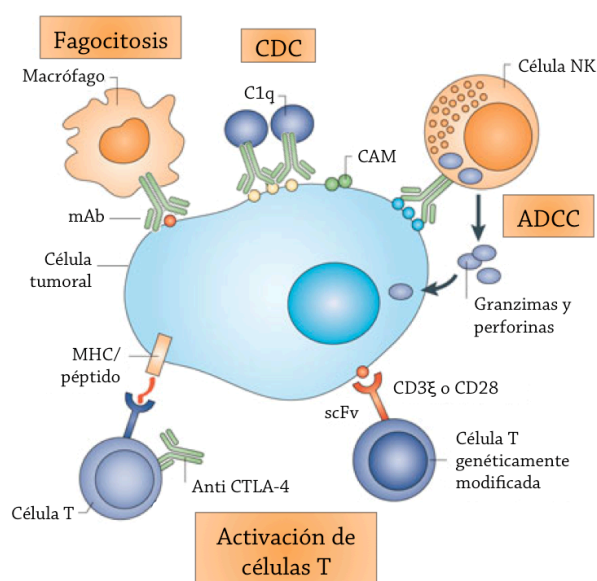
La unión de dos o más moléculas de IgG a la superficie de una célula tumoral puede conducir a la activación de la vía clásica del complemento. En primera instancia se produce una interacción de alta afinidad entre C1q y el dominio Fc del anticuerpo, seguida por la activación de la actividad enzimática C1r y la posterior activación de las proteínas del complemento. El resultado de esta cascada es la formación de poros en la membrana de las células malignas y su lisis (**Fig 2A**). Además, la producción de las moléculas del complemento altamente quimiotácticas C3a y C5a da lugar al reclutamiento y la activación de células efectoras inmunes como macrófagos, neutrófilos, basófilos, mastocitos y eosinófilos (Dunkelberger and Song, 2010; Zipfel and Skerka, 2009).

La capacidad de los distintos anticuerpos de unirse a las proteínas del complemento circulantes en sangre varía con los isotipos de las Ig. En humanos, las interacciones con IgM, IgG1 e IgG3 son fuertes, mientras que IgG2 es un inductor pobre e IgG4 carece de las funciones de activación del complemento (Bhutani and Vaishampayan, 2013). Entre las Ig de ratón, los isotipos IgG2a, IgG2b e IgM presentan las mayores tasas de fijación de complemento (Álvarez-Vallina, 2004).

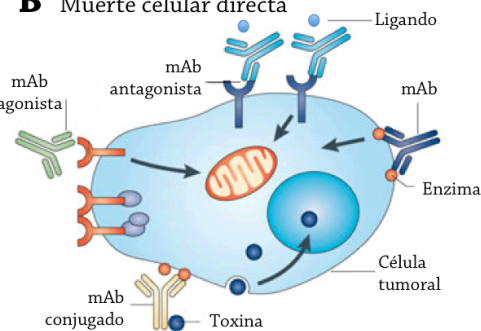
La relación entre la activación del complemento y la actividad terapéutica de un mAb se ha demostrado en varios estudios realizados con mAb aprobados para su uso clínico. El mAb anti CD20 rituximab depende parcialmente de la CDC para su eficacia *in vivo*.

En un modelo de terapia preclínica, el tratamiento con rituximab en ratones *knock out* para la proteína C1q no tuvo efecto protector antitumoral (Di Gaetano et al., 2003). También se ha demostrado una reducción de la actividad terapéutica de rituximab al deplecionar el complemento en modelos xenógrafos de linfoma de células B humanas (Cragg and Glennie, 2004). Además, se ha observado que ciertos polimorfismos genéticos del gen C1qA se correlacionan con una respuesta clínica diferencial a la terapia con rituximab en pacientes con linfoma folicular (Racila et al., 2008).

A Muerte celular mediada por el sistema inmune



B Muerte celular directa



C Alteración de la vasculatura y el estroma

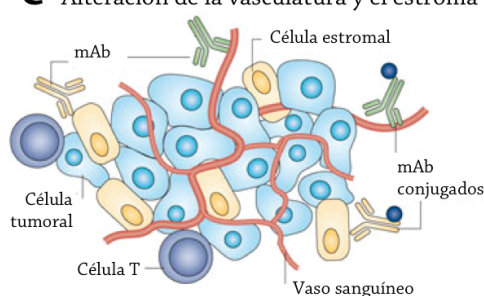


Figura 2. Ejemplos de mecanismos de inducción de muerte de células tumorales mediada por mAb.

(A) Muerte celular mediada por el sistema inmune. Puede consistir en la inducción de fagocitosis; CDC; ADCC; activación de células T modificadas genéticamente para reconocer a las células tumorales a través de un scFv; activación de células T mediante mAb inhibidores de receptores que inhiben la respuesta de las células T, como CTLA-4. **(B) Muerte celular directa.** Puede estar mediada por un mAb frente a un receptor de la superficie de la célula tumoral con actividad agonista, que al unirse al mismo conduce a la apoptosis (representada por la mitocondria); o con actividad antagonista al bloquear el mAb la señalización, dando lugar a apoptosis o a una disminución en la proliferación de la célula tumoral. También puede estar mediada por un mAb dirigido frente a una enzima dando lugar a la neutralización de la señalización o muerte de la célula tumoral. Por último, un mAb conjugado puede emplearse como vehículo para dirigir toxinas, drogas o radioisótopo hasta la célula tumoral. **(C) Alteración de la angiogénesis y/o el estroma tumoral.** Mediada por mAb antagonistas de receptores de proliferación endotelial; o mAb que secuestra a sus ligandos (no mostrado). También puede originarse por transporte dirigido de toxinas a las células endoteliales u otras células estromales.

CDC (complement dependent cytotoxicity); ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity); scFv (single chain variable fragment); CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4); MHC (complejo mayor de histocompatibilidad); MAC (complejo de ataque de membrana).

Adaptado de: Scott et al., 2012.

La optimización de la capacidad de activación del complemento de un mAb puede aumentar su actividad antitumoral. Por ejemplo, ofatumumab, un mAb específico frente a CD20 con la capacidad de inducción de CDC mejorada, fue aprobado para el tratamiento de pacientes con leucemia linfocítica crónica en 2009. Este mAb, de origen completamente humano, se une a un epítipo diferente y presenta una mejor cinética de unión que rituximab. Ofatumumab induce una potente lisis de las células tumorales mediante la mejora de la activación de la vía clásica del complemento (Coiffier et al., 2008). Un estudio en pacientes con leucemia linfocítica crónica refractaria mostró una tasa de respuesta del 50% a ofatumumab, lo que indica una mayor eficacia que rituximab, aunque esta mayor tasa de respuesta podría no ser únicamente debida a la mejora de CDC (Coiffier et al., 2008).

La mayoría de los mAb terapéuticos aprobados para su uso clínico que median ADCC también activan al sistema del complemento. Sin embargo, sigue siendo objeto de estudio la importancia clínica relativa de cada mecanismo y si los mecanismos son sinérgicos, aditivos o antagónicos (Wang et al., 2009).

1.3.3 Bloqueo de la unión del ligando a sus receptores en las células tumorales

Muchas de las moléculas diana de los mAb terapéuticos son receptores de factores de crecimiento que presentan una mayor expresión en las células tumorales. Al bloquear la unión del ligando y/o la señalización mediada por estos receptores, los mAb pueden disminuir la proliferación celular, inducir apoptosis y/o ayudar a aumentar la sensibilidad de los tumores a diversos agentes quimioterapéuticos (Adams and Weiner, 2005) (**Fig 2B**).

En diferentes tumores sólidos, se ha descrito la sobreexpresión de distintos miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, incluyendo EGFR (también llamado HER1 y ERBB1), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) y HER4 (ERBB4), siendo estos receptores las dianas moleculares de varios anticuerpos terapéuticos actualmente en uso.

Cetuximab es un mAb quimérico IgG1 específico de EGFR, que actúa bloqueando la unión del ligando y la dimerización del receptor, necesarias para iniciar la señalización a través de EGFR (Li et al., 2005). Panitumumab, un mAb completamente humano IgG2, también específico de EGFR, actúa de un modo similar (Kim, 2009). Ambos mAb se utilizan como terapia de segunda o tercera línea en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

A diferencia de EGFR, no se conoce al ligando de HER2 y los mAb terapéuticos dirigidos contra este receptor ejercen su función, principalmente, inhibiendo su homo/heterodimerización y favoreciendo su internalización. Aproximadamente un 30% de los cánceres de mama invasivos presentan amplificación del gen HER2 con la consiguiente sobreexpresión de su producto. HER2 también se sobreexpresa en algunos adenocarcinomas de pulmón, ovario, próstata y tracto gastrointestinal (Chen et al., 2003). Trastuzumab es un mAb humanizado IgG1, empleado actualmente en el tratamiento del cáncer de mama invasivo que presenta amplificación y sobreexpresión de HER2. Este mAb ejerce su acción antitumoral de forma directa, mediante la inhibición de la dimerización del receptor, promoviendo su endocitosis y posterior

proteólisis del receptor; y de forma indirecta, mediante la activación del sistema inmune (Hudis, 2007).

1.3.4 Inhibición de la angiogénesis tumoral

Los anticuerpos que modifican el microambiente tumoral e inhiben procesos tales como la angiogénesis también han demostrado su eficacia en la terapia del cáncer. Muchos tumores sólidos expresan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que estimula la angiogénesis tras unirse a su receptor en el endotelio vascular. Bevacizumab es un mAb humanizado, IgG1, específico de VEGF que bloquea la unión entre VEGF y su receptor. Este mAb está indicado para el tratamiento del cáncer de mama, colorrectal y de pulmón de células no pequeñas, en combinación con quimioterapia citotóxica (Ellis and Hicklin, 2008) **(Fig. 2C)**.

1.3.5 Activación de las células T del sistema inmune

Además de dirigirse directamente a las células tumorales, se han desarrollado otras estrategias terapéuticas basadas en mAb que mejoran la respuesta antitumoral del sistema inmune del paciente. Esto incluye mAb frente a receptores implicados en inmunorregulación y en la reversión de la inmunosupresión tumoral. Ipilimumab es un mAb completamente humano IgG1 dirigido frente a CTLA-4, un homólogo de CD28. CTLA-4 actúa como regulador negativo en la activación de células T al unirse a CD80 (también conocido como B7.1) y a CD86 (B7.2) con mayor afinidad que CD28. Publicaciones recientes han mostrado que el bloqueo de la señalización de CTLA-4 mediada por ipilimumab mejora las funciones efectoras de las células T e inhibe a las células T reguladoras (Treg), generando una mejor respuesta del sistema inmune frente al tumor (Peggs et al., 2009) **(Fig. 2A)**. Una segunda vía de co-inhibición utiliza al receptor de muerte celular programada 1 (PD-1), otro receptor inhibidor presente en las células T activadas. Cuando PD-1 se une a su ligando PD-L1, a menudo presente en las células tumorales, la capacidad de la célula T activada de producir una respuesta inmune eficaz disminuye. Los anticuerpos dirigidos contra PD-1, como nivolumab o pembrolizumab, son capaces de restaurar o aumentar la respuesta inmune antitumoral (Hamid et al., 2013). Estos mAb terapéuticos que intervienen en la regulación de la activación de las células T han sido recientemente aprobados para el tratamiento de melanomas no operables o metastásicos.

1.3.6 Transporte dirigido de agentes citotóxicos

Los agentes citotóxicos pueden ser dirigidos de forma específica a las células tumorales mediante su conjugación a un mAb. Esta estrategia limita los efectos secundarios sistémicos al permitir reducir la dosis terapéutica de dichos agentes (Hughes, 2010) **(Fig. 2B y C)**. Brentuximab vedotin, un conjugado de un mAb dirigido frente a CD30 y el agente antimitótico monometil auristatina E (MMAE) constituye un ejemplo de la eficacia de este formato. Este fármaco ha sido aprobado para el tratamiento del linfoma de Hodgkin refractario y el linfoma anaplásico sistémico (Younes et al., 2010). Otro ejemplo es ibritumomab tiuxetan, un mAb específico frente a CD20 conjugado al radioisótopo ^{90}Y , aprobado para el tratamiento de distintos tipos de linfomas no Hodgkin (Witzig et al., 2002).

2. Receptores de quimioquinas como diana para el tratamiento del cáncer

2.1 Las quimioquinas y sus receptores

2.1.1 Estructura y clasificación de las quimioquinas y sus receptores

Las quimioquinas son una familia de pequeñas citoquinas quimiotácticas, con 44 miembros en los seres humanos. Estas proteínas generan gradientes, solubles o inmovilizados, capaces de dirigir el movimiento celular (Zlotnik and Yoshie, 2000). Las quimioquinas, mediante el control del tráfico de leucocitos y su reclutamiento, desempeñan un papel clave en la homeostasis y el mantenimiento de la inmunidad innata y adquirida. También resultan esenciales en el desarrollo de los mamíferos y su organogénesis, y al igual que otras citoquinas, estimulan el crecimiento, la diferenciación y la activación celulares (Raman et al., 2011).

A nivel estructural, las quimioquinas se clasifican en cuatro grupos principales (CX3C, CXC, CC y C) en base al número y espaciamiento de los residuos de cisteína conservados de su extremo N-terminal (Bachelierie et al., 2014). Estas proteínas, a nivel funcional, se subdividen en "homeostáticas" o "inflamatorias", en función de si son constitutivamente secretadas por células situadas en los órganos linfoides o bien son liberadas en respuesta a estímulos inflamatorios (Rossi and Zlotnik, 2000).

Las quimioquinas ejercen sus efectos biológicos mediante su interacción con receptores específicos presentes en la superficie celular, los receptores de quimioquinas. Estructuralmente, éstos pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (GPCR). La familia de los receptores de quimioquinas consta de 24 miembros en los seres humanos y puede ser dividida, en base a la clase de quimioquinas a las que se unen, en cuatro subfamilias capaces de activar proteínas G (CX3CR, CXCR, CCR, y XCR), y una quinta subfamilia (ACKR), constituida por 6 receptores atípicos, incapaces de activar proteínas G tras la unión a su ligando (Bachelierie et al., 2014; Nibbs and Graham, 2013). El sistema quimioquina/receptor de quimioquina es altamente redundante, ya que algunas quimioquinas son capaces de unirse a múltiples receptores, y viceversa (**Fig. 3**).

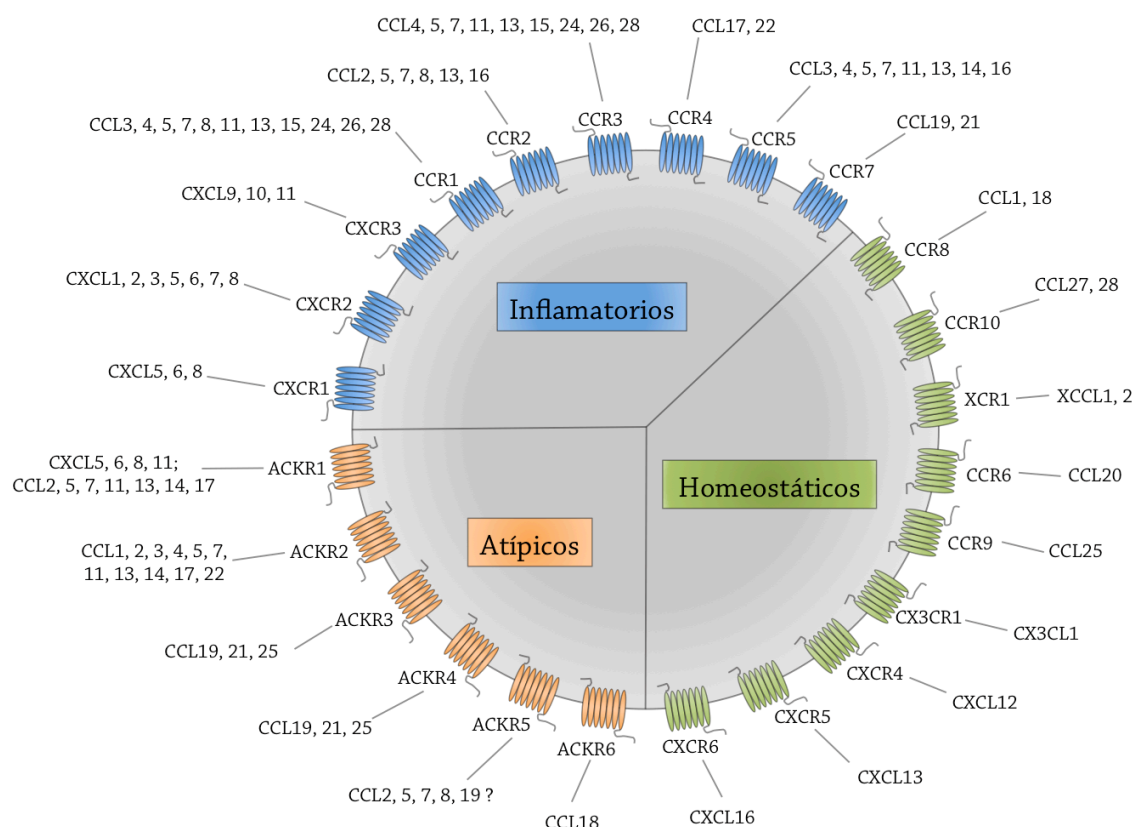


Figura 3. El sistema de quimioquinas y sus receptores.

Esquema en el que se representan los receptores de quimioquinas y sus ligandos, según la nomenclatura aprobada por la *LXXXIX International Union of Pharmacology* (Bachelierie et al., 2014). Las quimioquinas homeostáticas están implicadas en el desarrollo, la organogénesis y otros procesos fisiológicos. Las quimioquinas inflamatorias son inducibles y están implicadas en la respuesta inmune. Los receptores de quimioquina atípicos son, en general, incapaces de transducir señales a través de proteínas G, y actúan como reguladores negativos en el sistema, al secuestrar quimioquinas. En los tumores y su microambiente es frecuente la sobreexpresión de receptores de quimioquinas inflamatorias, homeostáticos y atípicos.

Adaptado de: Balkwill, 2012.

2.1.2 Señalización intracelular de los receptores de quimioquinas

La unión de una quimioquina a su receptor activa diferentes vías de señalización de forma casi simultánea, dando lugar a una variedad de respuestas celulares que incluyen quimiotaxis, supervivencia celular, proliferación, aumento de los niveles intracelulares de calcio y transcripción de determinados genes. La naturaleza precisa de estas vías depende del par quimioquina/receptor del que se trate, así como del tipo celular y su estado de diferenciación, maduración y activación.

El mecanismo de activación de los receptores de quimioquina está mediado por la interacción del receptor con una proteína G heterotrimérica, asociada con la superficie interna de la membrana plasmática. El heterotrímico se compone de las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, que en estado basal se encuentra unido al nucleótido GDP. Tras su activación por la unión de la quimioquina a su receptor, el GDP es liberado y sustituido

por GTP, dando lugar a la disociación del dímero $\beta\gamma$ y el monómero α al que permanece unido el GTP. El GTP se hidroliza rápidamente a GDP dando lugar a la reasociación del trímero de proteína G y el receptor. En base a su homología de secuencia, las subunidades $G\alpha$ se han dividido en cuatro familias: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$. Cada familia de subunidad $G\alpha$ transmite la señal de GPCR a través de diferentes rutas (Goldsmith and Dhanasekaran, 2007). Los receptores de quimioquinas son receptores acoplados principalmente a $G\alpha_i$ y, como tales, su señalización puede ser inhibida por la toxina pertúsica. No obstante, múltiples evidencias sugieren que la señalización de los receptores de quimioquinas no se limita a $G\alpha_i$ como se pensó inicialmente, y pueden acoplarse a otras proteínas $G\alpha$ (Rubin, 2009). La subunidad $G\alpha_s$ estimula la adenilciclasa mientras $G\alpha_i$ la inhibe. $G\alpha_q$ actúa a través de PLC, favoreciendo la hidrólisis de PIP2 en IP3 y DAG. A su vez, IP3 y DAG aumentan las concentraciones intracelulares de calcio libre y activan una serie de proteínas quinasas, incluyendo PKC (Mellado et al., 2001). Los receptores de quimioquinas asociados tanto a $G\alpha_i$ como a $G\alpha_q$ estimulan a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Por su parte, $G\alpha_{12}$ se asocia con proteínas G de bajo peso molecular tales como Rho y Ras (**Fig. 4**).

Una de las principales funciones de los receptores de quimioquinas es dar lugar a la quimiotaxis, o movilización dirigida de las células en respuesta a su quimioquina ligando. Ésta está mediada por PI3 quinasa (PI3K) (Ward, 2006), la cual puede ser activada tanto por las subunidades $G\beta\gamma$ como por $G\alpha$. La activación de PI3K puede resultar en la fosforilación de componentes de adhesión focal tales como la quinasa rica en prolina 2 (Pyk-2), el sustrato asociado a Crk (p130Cas), la quinasa de adhesión focal (FAK), paxilina, Nck, Crk y Crk-L (Wang et al., 2000a; Zhang et al., 2001). La quimiotaxis también puede ser mediada a través de PKC y MAPK o a través de $G\alpha_i$ y ERK 1/2 (Bendall et al., 2005).

Las quimioquinas pueden promover la supervivencia celular por dos mecanismos, la inactivación post traduccional de la maquinaria de muerte celular y por un aumento en la transcripción de genes relacionados con la supervivencia de las células (Barbero et al., 2003; Suzuki et al., 2001; Vlahakis et al., 2002). La señalización a través de $G\alpha_i$ desencadena la transcripción y expresión de determinados genes a mediante el eje PI3K-Akt-NFkB y también mediante MEK 1/2-ERK 1/2. ERK puede fosforilar y activar otras proteínas celulares, como p90rsk, así como translocarse al núcleo donde fosforila y/o activa factores de transcripción, dando lugar a cambios en la expresión génica y la progresión del ciclo celular. Algunas de las moléculas cuya expresión aumenta en respuesta a la señalización quimioquina/receptor son moléculas de adhesión, tales como VLA-4 (Ngo et al., 2008; Sanz-Rodriguez et al., 2001).

La oligomerización de los GPCR también parece desempeñar un papel en la modulación de la señalización mediada por estos. Por ejemplo, se ha observado que la homodimerización de CXCR4 desencadena la señalización de un modo independiente de proteína G, a través de la vía JAK/STAT (Mellado et al., 2001). Sin embargo, la relevancia de JAK/STAT en la transducción de señal de los receptores de quimioquinas ha sido cuestionado por algunos autores (Moriguchi et al., 2005).

La señalización a través de los receptores de quimioquinas se desensibiliza rápidamente tras la unión del ligando por la internalización del receptor. Además, después de la unión del ligando, el extremo C-terminal del receptor se fosforila

rápidamente en sus residuos serina por quinasas de GPCR (GRK) (Rubin, 2009). Este proceso va seguido por el reclutamiento de β -arrestina y por endocitosis mediada por clatrina. Sin embargo, las interacciones GRK- β -arrestina parecen desempeñar papeles diferentes en función de la clase de GRK implicada en la señalización, generando distintos efectos en la internalización del receptor, el flujo de calcio o la activación de ERK (Balabanian et al., 2008).

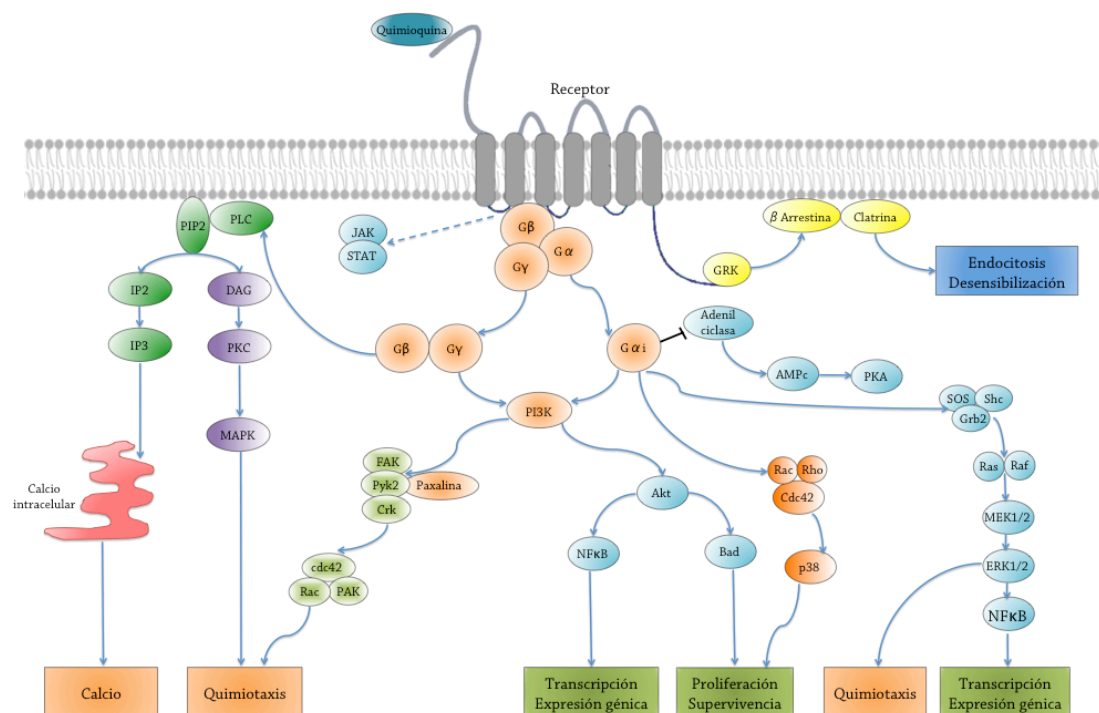


Figura 4. Transducción de señal a través de los receptores de quimioquinas.

Esquema en el que se representan distintas vías de señalización intracelular activadas por la interacción quimioquina-receptor. La activación de los receptores de quimioquinas desencadena una variedad de respuestas fisiológicas, tales como quimiotaxis, supervivencia y proliferación celular. Estos efectos son dependientes del eje quimioquina/ligando y del tipo celular.

Adaptado de Teicher and Fricker, 2010 para el eje CXCL12/CXCR4.

2.2 Receptores de quimioquinas en cáncer

Las quimioquinas y sus receptores han sido implicados en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias e infecciosas, incluyendo artritis reumatoide, esclerosis múltiple, asma, arteriosclerosis o SIDA (Garin and Proudfoot, 2011); y también en cáncer (Zlotnik, 2004). Los niveles de expresión de quimioquinas y sus receptores a menudo se desregulan en las células malignas, debido, por ejemplo, a la inactivación de genes supresores de tumores, a la activación constitutiva de oncogenes o la expresión alterada de factores de transcripción (Mantovani et al., 2010).

Muchas células tumorales sobreexpresan receptores de quimioquinas funcionales, no detectables en sus pares no transformadas. El receptor de quimioquinas más frecuentemente sobreexpresado en las células malignas es CXCR4 (Burger and Kipps,

2006). Está presente en más de 23 tipos diferentes de cáncer humano, incluyendo aquellos de mayor incidencia, tales como colorrectal, pulmón, mama, próstata, leucemia, cerebro, ovario, páncreas y melanoma (Balkwill, 2004). Los receptores sobreexpresados responden a las señales de quimioquinas promoviendo la supervivencia, proliferación, adhesión o migración de las células tumorales.

Existen múltiples evidencias de que la expresión de un determinado receptor de quimioquinas por un tumor dirige sus metástasis de modo preferente hacia los órganos en los que se secreta su quimioquina ligando correspondiente (Sarvaiya et al., 2013; Zlotnik et al., 2011). Un ejemplo es CCR7, cuya sobreexpresión es muy frecuente en carcinomas gástricos y se asocia con metástasis en los ganglios linfáticos y con un peor pronóstico clínico (Mashino et al., 2002).

No obstante, la expresión de quimioquinas y sus receptores tienen un papel complejo en la progresión del cáncer. En las primeras fases del desarrollo tumoral, las quimioquinas secretadas por las células iniciadoras del cáncer o por las células normales que las rodean, pueden ayudar a limitar el desarrollo del tumor al promover la migración de leucocitos hacia el lugar y la inducción de inmunidad antitumoral a largo plazo. Sin embargo, muchas quimioquinas también pueden promover una inflamación crónica que favorece la progresión tumoral (Lazennec and Richmond, 2010) o facilitar la angiogénesis en los tejidos asociados al tumor (Gupta et al., 1998; Tachibana et al., 1998).

2.3 mAb frente a receptores de quimioquinas para el tratamiento del cáncer

Todo lo anteriormente expuesto pone de manifiesto por qué los receptores de quimioquinas son atractivas dianas para nuevos fármacos antitumorales (Garin and Proudfoot, 2011). El enfoque inicial se centró en el desarrollo de pequeñas moléculas capaces de inhibir la señalización del receptor de quimioquinas, aunque el éxito de estas estrategias fue limitado (Allegretti et al., 2012; Debnath et al., 2013). Los recientes avances en el uso de mAb dirigidos a una variedad de moléculas para el tratamiento de leucemias, cáncer de mama, cáncer de colon y melanoma han contribuido a dirigir los esfuerzos hacia la generación de mAb con fines terapéuticos específicos frente a quimioquinas y sus receptores.

Actualmente, tres mAb frente a receptores de quimioquinas están siendo evaluados en ensayos clínicos como tratamiento para distintos tipos de cáncer, dirigidos frente a CXCR4, CCR2 y CCR4. Un resumen de las principales características de estos mAb se muestra en la **tabla 2**. Otros mAb dirigidos frente a diferentes receptores de quimioquinas han mostrado, en ensayos preclínicos, ser eficaces en modelos xenógrafos de cáncer (Bertolini et al., 2002; Brennecke et al., 2014; Chang et al., 2012; Gelmini et al., 2009; Li et al., 2011; Matsuo et al., 2009; Muller et al., 2001; Panjideh et al., 2014; Somovilla-Crespo et al., 2013; Tavor et al., 2004).

Tabla 2. mAb anti receptores de quimioquinas para terapia antitumoral actualmente en ensayos clínicos

Anticuerpo	Diana	Tipo de mAb	Indicación	Ensayo clínico (Fase, año, n°)	Mecanismo de acción propuesto
MDX-1338 (BMS-9365649, Ulocuplumab)	CXCR4	Humano, IgG4	Leucemia mieloide aguda	Fase I, 2010, NCT01120457	Inducción de apoptosis, antagonismo
MLN-1202	CCR2	Humanizado, IgG1	Metástasis en hueso	Fase II, 2010, NCT01015560	Antagonismo
KW-0761 (AMG-761, Mogamulizumab, Poteligeo)	CCR4	Humanizado, IgG1, defucosilado	Linfoma cutáneo de células T Leucemia/linfoma adulto de células T CCR4 ⁺	Fase III, 2012, NCT01728805 Aprobado, 2012 (en Japón)	ADCC

Nota: Otros ensayos clínicos para estos mab pueden consultarse en www.clinicaltrials.gov.

MDX-1338

Numerosas publicaciones han puesto de manifiesto el papel clave de CXCR4 en diversos aspectos fundamentales de la progresión tumoral, incluyendo proliferación, migración, invasión y angiogénesis (Darash-Yahana et al., 2004; Furusato et al., 2010). Se han desarrollado diversos proyectos para generar mAb terapéuticos anti CXCR4. El candidato más avanzado es MDX-1338, un mAb anti CXCR4 también denominado como BMS-936564. Este mAb se generó por inmunización de ratones transgénicos para los genes de Ig humanas, empleando células de ratón transfectadas con CXCR4 humano (Kuhne et al., 2013). MDX-1338 es un mAb de alta afinidad e isotipo IgG4, que bloquea la unión de CXCL12 a su receptor inhibiendo la migración y el flujo de calcio inducidos por CXCL12. MDX-1338 ha mostrado actividad antitumoral en modelos xenógrafos de leucemia mieloide aguda, linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple. En ensayos *in vitro* se ha visto que este mAb promueve apoptosis en las células tumorales, por lo que esta acción directa se ha propuesto como uno de los mecanismos por los que inhibe el crecimiento tumoral (Kuhne et al., 2013).

MDX-1338 acaba de completar un primer estudio clínico de fase I para evaluar su seguridad, tolerabilidad y farmacodinámica y eficacia preliminares. Los participantes en el estudio eran pacientes con recidiva de leucemia aguda mieloide y otras neoplasias de células B.

MLN-1202

La expresión de CCR2 en células tumorales de próstata y mama facilita las metástasis en hueso, donde se expresa su ligando, CCL2. Se han observado niveles séricos de CCL2 más elevados en pacientes de cáncer de próstata con metástasis óseas respecto a los pacientes con tumores localizados (Lu et al., 2009). Además, ensayos *in vitro* e *in vivo*, utilizando células de cáncer de próstata y de mama, mostraron que el eje CCR2/CCL2 promueve el crecimiento tumoral en el hueso (Lu and Kang, 2009; Lu et al., 2009).

Recientemente se ha evaluado la aplicación terapéutica de MLN-1202, un mAb humanizado anti CCR2, con actividad neutralizante, en un ensayo clínico de fase II (Vergunst et al., 2008). MLN-1202 se administró a pacientes con metástasis ósea con objeto de determinar su efecto sobre la proliferación de células tumorales, el tráfico de monocitos y macrófagos, y la maduración de osteoclastos. Los resultados del ensayo sugieren un efecto positivo del mAb en estos pacientes, en base a la cuantificación de la concentración en orina de N-telopéptidos, un marcador de las tasas de recambio óseo.

KW-0761

CCR4 es un receptor de quimioquinas expresado predominantemente en células T cooperadoras de tipo 2 (Th2), células T reguladoras (Treg) Foxp3⁺, un subconjunto de células CD4⁺ Th17, y células T infiltrantes en la piel positivas para el antígeno de linfocito cutáneo (CLA) (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Bonecchi et al., 1998; Campbell et al., 1999; Gobert et al., 2009). Este receptor une dos ligandos, CCL17 y CCL22. CCR4 ha sido implicado en la patología de algunas enfermedades inflamatorias y cáncer, encontrándose sobreexpresado en células de leucemia de células T en adultos, linfoma cutáneo de células T y linfoma periférico de células T (Ferenczi et al., 2002; Ishida et al., 2004; Ishida et al., 2003).

El mAb KW-0761, de nombre comercial mogamulizumab, es un mAb humanizado, defucosilado, de tipo IgG1, específico de CCR4. Deriva del mAb murino KM2160, posteriormente quimerizado dando lugar a KM2760 y finalmente humanizado y defucosilado (Ishii et al., 2010). Las tres versiones de este mAb reconocen un epítopo en la región N-terminal de CCR4 humano pero no bloquean la interacción entre CCR4 y sus ligandos ni inhiben la señalización mediada por CCR4.

KW-0761 fue aprobado para su uso en Japón en 2012 para el tratamiento de pacientes de leucemia de células T CCR4⁺ resistente o en recidiva. Es el primer mAb contra un receptor GPCR que se utiliza como fármaco para el tratamiento del cáncer. En otros países hay varios ensayos clínicos en curso, como uno en fase III para comparar la supervivencia libre de progresión tumoral, en pacientes con linfoma cutáneo de células T tratados previamente, a los que se les administra bien KW-0761 o bien vorinostat (un inhibidor químico de las histona deacetilasas).

2.4 El receptor de quimioquinas CCR9

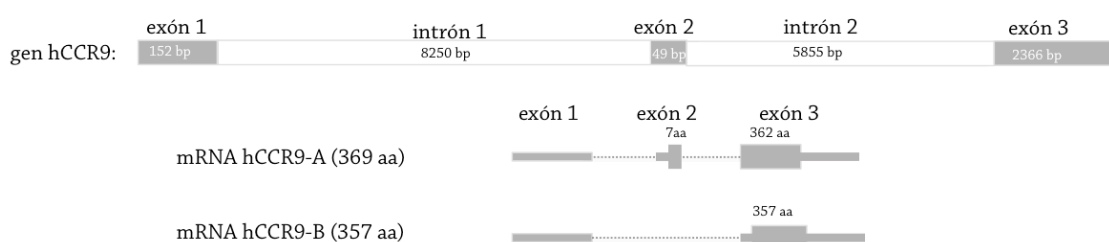
El receptor de quimioquinas humano 9 (CCR9) se identificó por primera vez en 1999, por dos grupos de investigación de forma simultánea (Youn et al., 1999; Zaballos et al., 1999). En condiciones fisiológicas, CCR9 se expresa en un conjunto muy limitado de leucocitos. Se ha descrito su expresión en timocitos (Carramolino et al., 2001; Zaballos et al., 1999), células infiltrantes en el intestino delgado (Kunkel et al., 2000), y en pequeñas subpoblaciones de células T de memoria circulantes (Zabel et al., 1999) y de células dendríticas plasmacitoides (Wendland et al., 2007). CCR9 sólo tiene una quimioquina ligando conocida, CCL25, también denominada TECK (*thymus expressed chemokine*).

En condiciones no patológicas, CCR9 juega un papel en el desarrollo de las células T y en su reclutamiento a tejidos específicos, mediado por su unión a CCL25. Esta

quimioquina se secreta por células epiteliales y dendríticas del timo (Vicari et al., 1997; Wurbel et al., 2000) y por células epiteliales del intestino delgado (Kunkel et al., 2000). Como resultado, se produce un enriquecimiento de células linfoides CCR9⁺ en el intestino delgado y en el colon en relación con su representación en linfocitos circulantes (Zaballos et al., 1999). También se ha observado que ratones deficientes en CCR9 presentan un fenotipo casi normal en ausencia de desafío inmunológico. A pesar de que uno de los principales sitios de expresión de CCL25 es el timo, no se observaron en estos ratones efectos importantes sobre el desarrollo intratímico de sus células T derivados de la ausencia de CCR9. Sin embargo, en condiciones inflamatorias, los ratones *knockout* para CCR9 sí mostraron una disminución en la migración de linfocitos hacia el intestino delgado (Wurbel et al., 2001).

Existen dos isoformas alternativas de CCR9 humano (hCCR9), ambas funcionales, denominadas A y B, siendo A la de expresión mayoritaria, en un ratio de 10:1, tanto en líneas de linfocitos T inmortalizadas, como en células mononucleares de sangre periférica y timocitos humanos (Yu et al., 2000). La isoforma A se ha establecido, pues, como la forma canónica de CCR9, que difiere de B en que posee 12 aa adicionales en el extremo N-terminal (**Fig 5A**). La secuencia completa de aa de hCCR9-A y la localización subcelular de cada dominio de este receptor de siete dominios transmembrana se muestra en las **figuras 5B y C**, respectivamente.

A



B

10	20	30	40	50
MFPTDFTSP	FNMAADDYGE	STSSMEDYVM	FNFTDFYCEK	NNVRQFASHF
Nt				
60	70	80	90	100
LPFLYNLVFI	VGALGNSLVI	LVYMYCTRVK	TMTDNFLNL	AIADLLFLVT
TM1				
110	120	130	140	150
LPFWAIAAAD	QWKFQTFMCK	VVNSMYKMF	YSCVLLIMCI	SVDRYIAIAQ
EC1				
160	170	180	190	200
AMRAHTWREK	RLLYSKMVCF	TIWVLAALC	IPEILYSQIK	EESGIAICTH
IC2				
210	220	230	240	250
VYPSDESTRL	KSAVLTILVI	LGFFLPFVVM	ACCYTIHHT	LIQAKSSKH
EC2				
260	270	280	290	300
KALKVTITVL	TVFVLSQFFY	NCILLVQTID	AYAMFISNCA	VSTNIDICFQ
TM6				
310	320	330	340	350
VTQTIAFFHS	CLNPFVLYVF	GERFRDLVK	TLKNLGCISQ	AQWYSFTRKE
TM7				
360	370	380	390	400
GSLKLSMML	ETTSGLSL			
Ct				

C

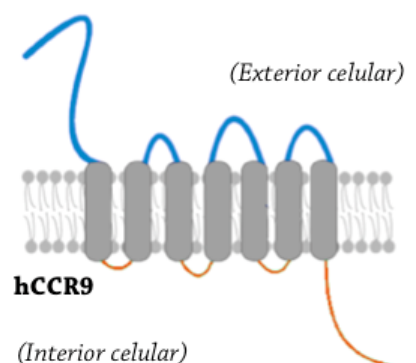


Figura 5. Esquema del gen y de la proteína hCCR9. Secuencia de aminoácidos.

(A) Esquema de los exones e intrones que componen el gen hCCR9. Se indica la composición de los transcritos que dan lugar a las dos isoformas de hCCR9. (B) Secuencia de aa de hCCR9-A. Los aa correspondientes a los dominios extracelulares se indican en color azul, a los dominios transmembrana en negro y a los dominios intracelulares en naranja. (C) Estructura de la proteína hCCR9. El receptor de quimioquinas CCR9 se organiza en la membrana plasmática con siete dominios transmembrana (gris); un extremo N-terminal y tres *loops* extracelulares (azul); y un dominio C-terminal y tres *loops* intracelulares (naranja).

2.5 CCR9 como diana terapéutica para el tratamiento del cáncer

La elección de un antígeno tumoral adecuado para la generación de anticuerpos terapéuticos requiere un análisis exhaustivo de su expresión en diferentes tipos de tumores y en tejidos normales, así como una comprensión de la función biológica del antígeno tanto en el tejido sano como el tumoral. En este sentido, los receptores de quimioquinas constituyen una diana de interés frente a la que desarrollar mAb terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

En el caso concreto del receptor de quimioquinas CCR9, se ha detectado su expresión en algunos tumores sólidos y hematológicos, como son cáncer colorrectal (Chen et al., 2012), melanomas (Amersi et al., 2008), cáncer de mama (Johnson-Holiday et al., 2011a) y leucemias linfocíticas agudas de células T (Qiuping et al., 2003). También se ha descrito la expresión de CCR9 en líneas celulares establecidas derivadas de cáncer de ovario y de próstata (Johnson et al., 2010; Sharma et al., 2010).

La transformación a células malignas puede dar lugar a la expresión de CCR9 en células que de manera normal no lo expresan. Se ha detectado la expresión de CCR9 en leucemias linfocíticas agudas de células T CD4⁺ en adultos, y con menor frecuencia en las crónicas, mientras que su expresión en células T CD4⁺ no patológicas es muy poco frecuente (Qiuping et al., 2003). Del mismo modo, ensayos de inmunohistoquímica mostraron que las muestras de tejido poco o moderadamente diferenciado de cáncer de mama expresan mayores niveles de CCR9 que los tejidos de mama no neoplásicos (Johnson-Holiday et al., 2011a).

La quimioquina CCL25 secretada por las células del epitelio intestinal puede actuar como polo de atracción de células metastásicas CCR9⁺ cuyos tumores primarios tienen origen externo al aparato gastrointestinal. La inmensa mayoría de las metástasis de melanoma que se localizan en el intestino delgado expresan CCR9, mientras que este receptor no se ha detectado en metástasis de melanoma en otros órganos. Una activación del eje CCR9/CCL25 podría ser la causa de la elevada incidencia de las metástasis de melanoma en intestino (Amersi et al., 2008). De forma inversa, en el caso de tumores primarios de colon e intestino, la activación del eje CCR9/CCL25 parece inhibir la capacidad de invasión y metástasis en los cánceres colorrectales. Los niveles de expresión determinados mediante inmunohistoquímica de CCR9 en adenomas de colon fueron los más elevados, y se observó cómo estos niveles decrecían con el aumento en la capacidad invasiva y metastásica de los distintos tipos de cáncer colorrectal analizados (Chen et al., 2012).

Se ha descrito que la expresión de CCR9 puede conferir ventajas competitivas a las células tumorales. La unión de CCL25 a su receptor aumenta la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis a través de la vía PI3K/Akt en carcinomas de ovario, mama y próstata (Johnson et al., 2010; Johnson-Holiday et al., 2011b; Sharma et al., 2010). En células de leucemia, se ha observado que el eje CCL25/CCR9 activa la cascada de señalización antiapoptótica de JNK1 (Qiuping et al., 2004) e induce proliferación celular vía Notch1 (Mirandola et al., 2012).

Todas estas características del eje CCR9/CCL25 lo convierten en un objetivo de interés para el tratamiento del cáncer. Hasta la fecha, se han desarrollado dos estrategias

experimentales que utilizan el eje CCR9/CCL25 como diana para el inhibir el crecimiento de tumores humanos CCR9⁺ en modelos xenogénicos. Por una parte, se ha utilizado la quimioquina CCL25 acoplada a la toxina PE38 para tratar xenoinjertos de células CCR9⁺ de la línea celular de leucemia linfocítica humana MOLT-4 (Hu et al., 2011). También se ha empleado un mAb anti CCL25, que bloquea su vía de señalización a través de CCR9, en combinación con el agente citotóxico etopósido, en un modelo xenógrafo de células CCR9⁺ (Sharma et al., 2010). Aunque los resultados de estos estudios son limitados, ambas estrategias proporcionaron las primeras evidencias de que CCR9 constituye una diana potencial para la inmunoterapia del cáncer.

Objetivos



La expresión diferencial de receptores de quimioquinas en las células tumorales, junto con su capacidad de conferirles ventajas competitivas, ha convertido a estas moléculas en dianas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos antitumorales. Entre ellos, el receptor CCR9 es un objetivo de interés en la búsqueda de tratamientos personalizados para pacientes con neoplasias, especialmente de origen hematológico.

Los objetivos generales de este trabajo son, pues:

- 1.** Generar anticuerpos monoclonales frente al receptor de quimioquinas CCR9 humano mediante inmunización génica.
- 2.** Caracterizar la especificidad, estructura y función de anticuerpos monoclonales anti CCR9; utilizando ensayos *in vitro* y modelos bioinformáticos.
- 3.** Evaluar la capacidad de los anticuerpos anti CCR9 de inhibir el crecimiento de tumores humanos en ratones inmunodeficientes y analizar sus posibles mecanismos de acción.
- 4.** Analizar la expresión de CCR9 en muestras tumorales humanas de diferentes orígenes, y su relación con la información diagnóstica disponible de los correspondientes pacientes.

Materiales y métodos

1. Cultivo celular

Las células se crecieron en medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Lonza); suplementado con 10% suero fetal de bovino (FBS, Lonza) previamente inactivado durante 30 min a 56°C, 2 mM L-glutamina (Lonza), 50 U/ml penicilina (Lonza) y 50 µg/ml estreptomicina (Lonza) (medio completo). Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

Las líneas celulares humanas MOLT-4 (CRL-1582) y Jurkat (TIB-152), de leucemia linfocítica aguda de células T, fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

Las células MOLT-4 bioluminiscentes (MOLT-4-luc) (Chamorro et al., 2014) se generaron por infección de células MOLT-4 con un lentivirus recombinante que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP) y luciferasa roja (Promega). Las células infectadas que expresaban altos niveles de EGFP fueron aisladas mediante un separador de células marcadas con fluorescencia (*fluorescence activated cell sorting*, FACS), clonadas, expandidas y utilizadas para ensayos de bioluminiscencia *in vivo*. Se comprobó que las células MOLT-4-luc mantenían el patrón de crecimiento de las células MOLT-4 parentales y conservaban el mismo nivel de expresión de CCR9 en su superficie.

Las células embrionarias de riñón humano HEK-293 (CRL-1573) se transfectaron de manera estable mediante electroporación con vectores pCI-neo (pCIneo) con insertos que codificaban para la expresión de diferentes receptores de quimioquinas (Chamorro et al., 2014). Se seleccionaron en presencia de 1 mg/ml del antibiótico G418 (Sigma-Aldrich) y se clonaron. Los clones que expresaban altos niveles del receptor de quimioquinas correspondiente se identificaron mediante citometría de flujo. Las células transfectadas establemente con los receptores hCCR4 y hCCR5 fueron generosamente cedidas por el Dr. A. Zaballo (ISCI, Madrid), y las células transfectadas con hCCR6 y hCCR8 se generaron anteriormente por el mismo grupo de investigación (Carramolino et al., 1999; Goya et al., 1998). Los clones se crecieron en medio completo en presencia de 1 mg/ml de G418 y se comprobó que mantenían la expresión de la proteína de interés antes de emplearlos en cada experimento.

Los leucocitos de sangre periférica y los timocitos, obtenidos a partir de fragmentos de timo extirpados durante cirugía cardíaca, fueron obtenidos después de recibir el consentimiento informado de los pacientes de acuerdo con la Declaración de Helsinki y conforme a las indicaciones del Comité de Ética de la Investigación conjunto del CNB-CBMSO/CSIC (Martin-Gayo et al., 2010).

2. Generación de anticuerpos

2.1. Inmunización de ratones BALB/c

Los anticuerpos anti hCCR9 se generaron mediante inmunización intradérmica de seis ratones hembras BALB/c (10-12 semanas de edad) empleando una pistola genética Helios (BioRad). Cada ratón fue inoculado con 2 µg de partículas de oro de 1,6 nm (BioRad) recubiertas con un vector plasmídico pCIneo que contenía la secuencia del

cDNA de hCCR9 los días 0 y 30 de la inmunización. El día 45 se extrajo suero de los ratones que se utilizó para analizar la presencia de anticuerpos específicos anti hCCR9 mediante citometría de flujo frente a células HEK-293 transfectadas con pCIneo-hCCR9 o con el vector pCIneo vacío (control negativo). Se seleccionaron los ratones con mejor respuesta inmune y se les administraron dos inyecciones por vía intravenosa, con 10^7 células HEK-293 transfectadas con pCIneo-hCCR9, los días 57 y 58 de la pauta de inmunización.

2.2 Fusión celular

El día 60, se procedió a la fusión de los esplenocitos de ratón con células de mieloma murino no productor de Ig. El bazo de los ratones inmunizados se disgregó, y los esplenocitos se fusionaron con células de la línea tumoral de ratón P3-X63.Ag8.653, utilizando polietilenglicol (PEG) como agente fusogénico (Kohler and Milstein, 1975) (Kremer and Marquez, 2004). Las células del mieloma empleado son deficientes en dos enzimas implicadas en la vía de recuperación de ácidos nucleicos, la timidina kinasa (TK) y la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). Los productos de la fusión celular se repartieron en placas de 96 pocillos y se cultivaron en un medio selectivo que contenía azaserina 10 nM (Sigma-Aldrich), hipoxantina y timidina ClonaCell-HY E (StemCell Technologies). Tan sólo aquellas células resultantes de la fusión entre un linfocito y una célula de mieloma son capaces de dividirse ilimitadamente en este medio selectivo.

2.3 Selección de hibridomas y estabilización por dilución límite

La presencia de anticuerpos específicos de hCCR9 secretados al medio de cultivo de los pocillos de la fusión fue analizada el día 15 después de plaqueada la fusión. Los medios de cultivo condicionados por el crecimiento de hibridomas se analizaron mediante citometría de flujo utilizando células HEK-293 transfectadas con pCIneo-hCCR9 o con el plásmido pCIneo vacío como control negativo. Las células híbridas obtenidas tras el proceso de fusión contienen un número elevado de cromosomas, y en las sucesivas divisiones celulares algunos tienden a perderse. Como consecuencia, algunas células pierden la capacidad de producción de una o de las dos cadenas de Ig, o bien funciones básicas para la viabilidad celular. Por tanto, tan pronto como se identifica como positivo un pocillo, las células del mismo deben someterse a un proceso de clonación. Los hibridomas productores de los mAb 91R y 92R, se sometieron a tres ciclos de clonación por dilución límite seguidos del control, por citometría de flujo, de la secreción de mAb anti hCCR9, entre 10 y 12 días después de iniciar cada proceso de clonación.

2.4 Purificación de mAb

Los clones de hibridoma seleccionados, 91R y 92R, se crecieron en medio completo y se fue aumentando el volumen de cultivo hasta llegar a 0,5 a 1 L de cultivo; y disminuyendo el porcentaje de FBS de forma progresiva hasta el 3,5% de FBS, para reducir la concentración de Ig bovinas. Los anticuerpos secretados se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columnas HiTrap de proteína G acoplada a sefarosa (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.5 Determinación de isotipo y biotinilación de mAb

El isotipo de los mAb purificados se determinó mediante ELISA, utilizando anticuerpos de cabra anti IgG de ratón específicos de cada isotipo, conjugados a HRP (Southern Biotech) (Hornbeck et al., 2001). Los mAb se biotinilaron en sus grupos carbohidrato, utilizando el reactivo EZ-Link Hidrazide-LC-Biotin (Thermo Scientific), conforme a las indicaciones del fabricante. La eficiencia de biotinilación se evaluó mediante ELISA y citometría de flujo. Se tituló el mAb marcado utilizando en paralelo estreptavidina y un anticuerpo secundario anti Ig de ratón, conjugados a peroxidasa.

3. Silenciamiento génico

Para el silenciamiento génico del receptor de quimioquinas hCCR9-A (secuencia de referencia NCBI: NM_031200) expresado de forma endógena en células de leucemia linfocítica humana MOLT-4, se emplearon partículas lentivirales portadoras de shRNA. Las partículas lentivirales se prepararon utilizando los vectores productores de proteínas de empaquetamiento pCMV-dR8.91 y pMD2.G (Addgene) junto con diferentes vectores de expresión de shRNA (Mission SHCLNG, Sigma-Aldrich). Cada vector de expresión de shRNA se cotransfectó junto con pCMV-dR8.91 y pMD2.G en células HEK-293T utilizando OptiMEM (Life Technologies). Transcurridas 48 h, el medio enriquecido con partículas lentivirales se recolectó y se pasó por un filtro estéril de 0,45 μm (Millipore) (Tiscornia et al., 2006). El título viral se determinó mediante tinción de unidades formadoras de placas (ufp) con el colorante catiónico cristal violeta (Sigma-Aldrich).

Se plaquearon 2×10^5 células MOLT-4 en 1 ml de medio completo, 24 h antes de la infección con 350 ufp del pseudovirus indicado. Transcurridas 48 h, se sustituyó el medio por medio completo suplementado con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puomicina (Life Technologies), para seleccionar las células infectadas. Las células se cultivaron durante siete días y entonces se realizó un análisis de la expresión de hCCR9. Se probaron cinco secuencias de shRNA-CCR9 distintas, y se seleccionó aquella que dio lugar a los niveles más bajos expresión de CCR9 determinados mediante RT-qPCR y citometría de flujo, que es la que se indica en la **tabla 3**.

Tabla 3. Secuencias de los shRNA codificados por los plásmidos Mission SHCLNG utilizados

shRNA	Nº TRC	Secuencia 5'-3'
shRNA control	SHC-002	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTC GAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTT
shRNA-CCR9	TRCN0000008221	CCGGCTGATGACTATGGCTCTGAATCTC GAGATTCAGAGCCATAGTCATCAGTTTT

4. Citometría de flujo

4.1 Tinción de células en cultivo

Las células a analizar, 2×10^5 por pocillo, se centrifugaron en placas de 96 pocillos de fondo en V (Nunc) y se lavaron con tampón fosfato salino (1 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7; PBS) con 0,5% albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich), 1% FBS y 0,1% azida sódica (PBSst). Para bloquear las uniones inespecíficas, las células se pre incubaron (30 min, 4°C) en PBSst con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG de rata (Sigma-Aldrich) en un volumen final de 100 μl . En los marcajes directos, las células se incubaron con el anticuerpo primario conjugado a un fluorocromo (30 min, 4°C), se lavaron y se analizaron. En los marcajes indirectos, las células se incubaron con el anticuerpo primario sin marcar (30 min, 4°C), se lavaron, y posteriormente se incubaron con una solución de fragmentos F(ab')_2 de anticuerpos de cabra anti IgG de ratón (H+L) marcados con un fluorocromo (Beckman Coulter). Se empleó siempre como control un mAb del mismo isotipo marcado con el mismo fluorocromo que el correspondiente mAb primario marcado o un mAb control isotípico sin marcar, conforme al ensayo realizado. Las muestras se analizaron en un citómetro Cytomics FC500 de Bekman Coulter y los datos se procesaron con el programa FlowJo.

En los ensayos de competición entre distintos mAb, las células se preincubaron con 50 μl de PBSst conteniendo el mAb competidor sin marcar (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min, 4°C). A continuación, se añadieron 50 μl de PBSst conteniendo el mAb correspondiente marcado con biotina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 min, 4°C). Tras una etapa de lavado, las células se incubaron con estreptavidina marcada con ficoeritrina (PE) y se analizaron por citometría de flujo.

En los ensayos de competición quimioquina-mAb, las células se preincubaron con 50 μl de PBSst conteniendo hCCL25 o hCXCL12 recombinantes (Peprotech, 700 nM, 40 min, 4°C). A continuación, se añadieron 50 μl de PBSst conteniendo 91R o el mAb control (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min, 4°C). Tras una etapa de lavado, las células se incubaron con una solución de fragmentos F(ab')_2 de Ig de cabra anti IgG de ratón (H+L) marcados con PE (Beckman Coulter) y se analizaron por citometría de flujo.

4.2 Tinción de células de muestras de sangre o médula ósea

Las muestras de pacientes de diferentes neoplasias hematológicas se obtuvieron tras obtener el consentimiento informado de los pacientes y en el contexto de un proyecto de investigación conjunto con la Dra. Cecilia Muñoz del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Princesa. El proyecto fue evaluado y aprobado por parte de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario de la Princesa y del Comité de Ética de la Investigación conjunto del CNB/CBMSO.

Para la tinción, 100 μl de las muestras de sangre periférica o médula ósea se incubaron durante 30 min a 4 °C con una mezcla de los siguientes anticuerpos: i) los anticuerpos primarios marcados indicados en cada caso a concentraciones óptimas (de 1 a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$); ii) el mAb 91R o su control isotípico (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$); iii) fragmentos F(ab')_2 de Ab de cabra anti IgG de ratón (H+L) marcados con FITC. A continuación, se lisaron los eritrocitos utilizando la solución *Fluorescein-activated cell sorter lysing solution* (Becton

Dickinson) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, los leucocitos se resuspendieron en 500 µl de PBS enfriado en hielo.

El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Se emplearon los programas CellQuest (Becton Dickinson) para la adquisición y FlowJo para el análisis. En todos los casos se adquirió un mínimo de 5.000 células neoplásicas.

5. Ensayo de movilización de calcio intracelular

Se emplearon células MOLT-4, resuspendidas a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células por ml de medio completo, las cuales se incubaron durante 30 min con el agente quelante de calcio Fura-03 AM (Molecular Probes; 6,25 M). Tras tres lavados con PBS, las células cargadas se resuspendieron en medio completo con CaCl_2 2 mM a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml. A continuación, se añadió CCL25 humana recombinante (Peprtech; 50 nM) y se incubó durante los tiempos indicados. La fluorescencia generada por el flujo de calcio hacia el citoplasma de las células se midió en un citómetro de flujo Epics XL (Bekman Coulter) y se analizó con el programa FlowJo. Se utilizó ionomicina (Life Technologies; 5 µg/ml) para abrir inespecíficamente todos los canales de calcio y determinar la cantidad máxima de calcio movilizable en cada muestra.

6. Ensayo de migración celular

La quimiotaxis se determinó por triplicado, en cámaras de cultivo celular Transwell (Costar; diámetro de poro 5 µm). En la cámara superior se añadieron un total de 10^5 células resuspendidas en 100 µl de DMEM-0,5% BSA con el mAb indicado a una concentración final de 10 a 100 µg/ml. En la cámara inferior se añadieron 600 µl de DMEM-0,5% BSA con CCL25 humana recombinante (Peprtech; 200 nM). Se permitió la migración celular durante 4 h en un incubador a 37°C. Las células que migraron fueron recogidas de la cámara inferior y contadas en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Bekman Coulter). Se realizó un recuento de eventos dentro de la población de células vivas durante un período de 60 segundos a flujo constante.

7. Enzimoinmunoensayo (ELISA)

Se utilizó un ELISA para evaluar la competición entre anticuerpos por la unión a su antígeno. Se incubaron placas de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc) con 100 µl de un péptido sintético correspondiente a los aa de las posiciones 2-22 de hCCR9-A a 0,2 µg/ml en PBS (24 h, 4°C). La síntesis del péptido se realizó en la Unidad de Proteómica del CNB/CSIC utilizando protocolos de 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Tras un lavado de la placa, esta se bloqueó con 180 µl de PBS-0,5% BSA (1 h, temperatura ambiente (RT)), se lavó y se añadieron 90 µl del mAb competidor frío en PBS-0,5% BSA (20 µg/ml, 30 min, RT). En el mismo pocillo, a continuación, se añadieron 20 µl del mAb correspondiente marcado con biotina en PBS-0,5% BSA (5 µg/ml, 20 min, 4°C). Tras tres lavados, se añadieron 80 µl de estreptavidina-HRP (GE Healthcare), se lavó tres veces más y se reveló con 80 µl de sustrato o-fenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) a 0,4 mg/ml en tampón citrato 0,05 M, pH 5. Se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas modelo 680 (Biorad).

8. Electroforesis en gel de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunodetección

Se prepararon extractos de membrana a partir de células cultivadas en suspensión y en fase de crecimiento exponencial. Las células se centrifugaron y se lavaron con PBS. A continuación, las células (5×10^6) se resuspendieron en tampón hipotónico (50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4), se sometieron a cuatro ciclos de congelación-descongelación y se centrifugaron ($750 \times g$, 2 min, 4°C) para precipitar los núcleos y las células intactas remanentes. Los sobrenadantes se trasladaron a otro tubo y se centrifugaron nuevamente ($18.000 \times g$, 30 min, 4°C). La fracción de membranas sedimentada se resuspendió en PBS con inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) y se solubilizó diluyéndola en un volumen igual de PBS-20% SDS-100 mM ditiotreitól (30 min, RT). Las proteínas de la muestra se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol y se transfirieron a membranas de Immobilon PVDF (Millipore). Las membranas se incubaron con tampón de bloqueo (5% BSA, 5% leche en polvo desnatada y 0,05% Tween 20 en PBS, una noche, 4°C), seguido por una incubación con el mAb 91R disuelto en el tampón de bloqueo (1 μ g/ml, 2 h, RT). A continuación se incubó con un anticuerpo de cabra frente a Ig de ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas fueron lavadas y reveladas con ECL Western Blotting Substrate (GE Healthcare). Para controlar la carga de los diferentes carriles de la electroforesis, las membranas fueron reutilizadas e incubadas con anticuerpos anti hCD71 (0,4 mg/ml, 2 h, RT). Cuando se indica, las muestras proteicas fueron N-desglicosiladas utilizando la enzima N-glicosidasa F (PNGase F, New England Biolabs; 1 h, 37°C).

9. Resonancia de plasmón de superficie (SPR)

Los ensayos de SPR se llevaron a cabo en un biosensor robotizado, modelo Biacore 3000 (GE Helthcare) utilizando chips sensores CM5, recubiertos por una capa de carboximetil dextrano. El tampón empleado fue HBS-EP (10 mM Hepes pH 7.4, 200 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactante polisorbato 20 (P20))

Para el estudio de las constantes cinéticas y de afinidad de la interacción, se inmovilizó el péptido correspondiente a los aa 2-22 de hCCR9-A en la *flow cell* 2 (FC2) del *sensor chip* mediante acoplamiento a través de grupos amino. Para la activación de la superficie se inyectó N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,05 M con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0,2 M a un flujo de 5 μ l/min durante 7 min. A continuación se inyectó el péptido a 20 μ g/ml en tampón acetato de sodio 20 mM, pH 3,0, durante 2 min. Finalmente, se bloquearon los sitios que continuaban activos sobre la superficie del chip con etanolamina 1 M, pH 8,5 durante un tiempo de contacto de 7 min. Como superficie de referencia se empleó la FC1, la cual se sometió al mismo proceso de activación/desactivación, pero en ausencia de ligando.

Se inyectaron diferentes concentraciones por duplicado de los mAb anti CCR9 91R y 92R (0,41; 1,23; 3,7; 11,1; 33,3 y 100 nM) a un flujo de trabajo de 30 μ l/min, con un tiempo de asociación de 3 min y un tiempo de disociación de 3 min. Para regenerar la superficie del chip sensor se empleó glicina-HCl 10 mM, pH 1,5 con un tiempo de

contacto de 30 s. Como control negativo se empleó otro anticuerpo monoclonal del mismo isotipo, en las mismas condiciones experimentales. Los sensorgramas obtenidos correspondientes a las distintas concentraciones de mAb fueron superpuestos, alineados y analizados con el programa BIAevaluation 4.1, ajustando los datos a un modelo de interacción 1:1 (de Langmuir). La reproducibilidad del ensayo se analizó mediante la evaluación de la variabilidad en un mismo día y entre diferentes días. También se analizó la variabilidad de la señal utilizando diferentes superficies y distintos lotes de anticuerpo. Se comprobó que no existía deficiencia en el transporte de masas variando la velocidad de flujo. Todos los datos fueron procesados utilizando el método de doble referencia (Myszka, 2000).

10. Análisis Pepscan

La síntesis simultánea de péptidos múltiples sobre una membrana de celulosa se realizó en la Unidad de Proteómica del CNB/CSIC, utilizando protocolos Fmoc. Los péptidos se sintetizaron mediante conjugación secuencial de aminoácidos protegidos a la membrana, a partir de sus extremos carboxilo terminal. La aplicación de los aminoácidos activados se llevó a cabo de forma automática utilizando el robot Auto-Spot Robot ASP222 (Abimed). Cada membrana contenía un conjunto de péptidos de 12 aminoácidos de largo, cuyas secuencias estaban superpuestas en 10 aminoácidos y que cubrían la secuencia completa de la isoforma A de hCCR9 (369 aminoácidos). También se sintetizaron conjuntos de péptidos correspondientes a los aa 8-19 de la secuencia de hCCR9-A, en los que se sustituyó una de las posiciones correspondientes a los residuos 11, 12, 13, 14, 15 o 16 por cada uno de los restantes aa proteinogénicos. Las membranas se incubaron en tampón de bloqueo, seguido por un mAb anti hCCR9 (1 µg/ml, 2 h, RT). A continuación, se incubó con un anticuerpo de cabra frente a Ig de ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas fueron reveladas con ECL Western Blotting Substrate (GE Healthcare). Se realizaron varias exposiciones y se eligió aquellas películas que mostraban señales máximas antes de llegar a saturación. La cuantificación densitométrica de la señal obtenida en cada punto de las películas se realizó con el programa ImageJ. Los datos resultantes se expresaron como porcentajes respecto a la señal obtenida para el péptido correspondiente a los aa 8-19 de la secuencia de hCCR9-A sin modificar.

11. Secuenciación de las regiones variables de anticuerpos

11.1 Aislamiento de RNA, RT-PCR y amplificación

Se utilizaron los oligonucleótidos degenerados previamente descritos (Wang et al., 2000b) para la amplificación por PCR de las regiones variables de los genes de IgG murina de los hibridomas 91R y 92R. Se extrajo RNA a partir de 10^5 células mediante el kit RNEasy Mini Kit (Quiagen). El RNA resultante (1 µg de RNA total en 10 µl de volumen final) se retrotranscribió a cDNA mediante el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo dictado por el fabricante (25°C, 10 min; 37°C, 2h) usando un termociclador MWG AG Biotech Primus 96. El cDNA resultante se amplificó utilizando Taq DNA polimerasa (New England Biolabs). Cada reacción de PCR contenía 1 µg de cDNA, 0,1 µM de oligo 5', 0,1 µM de oligo 3', 100 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, tampón de Taq polimerasa 1x y 1,25 U de

Taq Pol en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron: (94°C, 3 min) x 1; (94°C, 1 min; 45°C, 1 min; 72°C, 2 min) x 30; (72°C, 10 min) x 1.

Los productos de amplificación de las regiones variables de las cadenas pesadas se limpiaron con el reactivo Illustra Exo-ProStar (GE Healthcare) y directamente se secuenciaron utilizando los mismo oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR (realizado por Secugen).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar el cDNA de las regiones variables de IgG murinas

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
3' IgG2b	GGAAGATCTAGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG
3' IgG2a	GGAAGATCTCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
5' MH1	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
5' MH2	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
3' Kc	GGTGCATGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC
5' Mk	GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA

11.2 Clonaje de fragmentos de PCR y obtención de plásmidos de colonia aislada

Los productos de amplificación de las regiones variables de las cadenas ligeras se cargaron en un gel de agarosa (GellyPhor) y se limpió la banda del tamaño esperado (≈ 400 pb) utilizando el kit Wizard SV Gen and PCR Clean-up System (Promega). Los fragmentos resultante se digirieron con las enzimas SacI y SphI (New Englan Biolabs) y se clonaron en el el sitio de clonaje múltiple del vector pGEM-3Zf(+), previamente digerido con las mismas enzimas y limpiado con el mismo kit. Inserto y vector se ligaron con T4 DNA Ligasa (New England Biolabs) y el producto se empleó para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5α que posteriormente fueron sembradas en placas de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (100 µg/ml). Se picaron colonias aisladas, se crecieron en 4 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y se purificaron los diferentes plásmidos utilizando GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Los plásmidos resultantes se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos T7 Fw y SP6 Rv (Secugen).

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para secuenciar los fragmentos clonados en el vector pGEM-3Zf(+)

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
T7 Fw ²	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6Rv ²	ATTTAGGTGACACTATAG

11.3 Análisis de secuencias

Los fragmentos de secuencia de las regiones variables de las dos cadenas de IgG se analizaron utilizando el programa 4Peaks. Para cada cadena pesada se obtuvo una secuencia consenso obtenida a partir de al menos 16 secuencias. De cada hibridoma se obtuvieron dos extractos de RNA distintos, de cada uno de los cuales se obtuvieron dos cDNA, y a su vez, de cada uno se obtuvieron al menos dos 2 PCR. Para cada cadena ligera se obtuvo una secuencia consenso obtenida a partir de al menos 10 secuencias.

En este caso, de cada cDNA se realizaron dos 2 PCR, que se clonaron y se analizaron 5 clones obtenidos a partir de cada una.

11.4 Confirmación de las secuencias de aminoácidos mediante técnicas de proteómica

Para determinar los aa correspondientes al extremo N-terminal de las distintas cadenas, se llevó a cabo su secuenciación mediante degradación de Edman. Los mAb 91R y 92R se purificaron por afinidad en una columna de proteína G sefarosa y se resolvieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se recortaron las bandas del gel correspondientes a las cadenas pesada y ligera de cada mAb, que se utilizaron para llevar a cabo una degradación secuencial de Edman por el Servicio de Química de Proteínas del CIB/CSIC, utilizando un equipo Procise 494 (Applied Biosystems). Se identificaron los primeros 16-17 aa de cada cadena polipeptídica.

Para confirmar si la secuencia completa de cada cadena predicha era correcta, se realizaron análisis MS MALDI-TOF (*mass spectrometry matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight*) en la Unidad de Proteómica del CNB/CSIC. Para ello, se partió de bandas de geles de poliacrilamida de los mAb 91R y 92R resueltos en condiciones desnaturalizantes. Los fragmentos obtenidos se digirieron con tripsina y quimotripsina y se analizaron utilizando un espectrómetro de masas modelo ABi 4800 (Applied Biosystems).

12. Modelado estructural y de interacciones péptido-anticuerpo

El modelado y análisis estructural de mAb se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Mónica Chagoyen, jefa del Servicio de Análisis de Secuencias y Predicción de Estructura del CNB/CSIC. Para la modelización estructural de las regiones variables del mAb 91R, en base a su secuencia de aminoácidos, se emplearon dos programas distintos, RosettaAntibody (Sircar et al., 2009) y PIGS (Marcatili et al., 2008), para la modelización estructural de las regiones variables del mAb 91R, en base a su secuencia de aminoácidos. Se utilizó el programa PepSite2 (Trabuco et al., 2012) para la identificación del sitio de unión más probable entre los modelos tridimensionales obtenidos para 91R y un péptido correspondiente a los aa 11-16 de la secuencia de hCCR9-A. De esta forma, se resolvieron las direcciones y orientaciones más probables de dicho péptido en su interacción con 91R. Esta información se utilizó para establecer la posición inicial del péptido para el modelado de las interacciones entre el péptido hCCR9-A(10-18) y los modelos obtenidos para la estructura de 91R con el programa Rosetta FlexPepDock (London et al., 2011). Finalmente, se empleó el programa LigPlot+ (Laskowski and Swindells, 2011) para el análisis de los sitios de interacción y la generación de un diagrama de los puentes de hidrógeno y de contactos hidrofóbicos entre los modelos de estructura de 91R y el péptido hCCR9-A(10-18).

13. Ensayos xenogénicos

Los ratones BALB/c Rag2^{-/-} (Taconic Biosciences) se mantuvieron en las instalaciones del servicio de animalario del CNB/CSIC. Se utilizaron ratones hembra con una edad de entre 8 y 22 semanas. El mantenimiento de los animales y los protocolos

experimentales utilizados siguieron las normativas de la Unión Europea y de España para experimentación animal y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CSIC.

Para los experimentos *in vivo*, las células MOLT-4 (2×10^6) se inocularon por vía subcutánea (s.c.) en el día 0 en uno de los flancos de ratones BALB/c Rag2^{-/-} hembra. Los mAb 91R, 92R o los mAb control isotípico (IgG2b e IgG2a) se inocularon intraperitonealmente (i.p.), en cuatro grupos de 9 ratones cada uno, en los días 1, 8, 15 y 22 (4 mg/kg los días 1 y 8; 2 mg/kg los días 15 y 22). En un segundo experimento, las células MOLT-4 (2×10^6) se inocularon s.c. en uno de los flancos de hembras BALB/c Rag2^{-/-}. Los mAb 91R o control IgG2b se inocularon i.p. en dos grupos de 10 ratones cada uno en los días 7, 14, 21 y 28 (4 mg/kg los días 7 y 14; 2 mg/kg los días 21 y 28). El tamaño de los tumores se midió con un vernier caliper (Mitutoyo) y el volumen tumoral se calculó siguiendo la fórmula: volumen (mm³) = [longitud del diámetro axial, mm] x [(diámetro rotacional, mm)²/2]. La carga tumoral se expresó como el porcentaje del volumen tumoral en relación al obtenido en los ratones tratados con el mAb control IgG2b. Los ratones se sacrificaron en los días 78 ó 69, dependiendo del experimento; y los tumores fueron extraídos, pesados, fotografiados y procesados para inmunohistoquímica.

En los ensayos xenogénicos monitorizados mediante análisis de bioluminiscencia, 2×10^6 células MOLT-4-luc se inocularon s.c. en cada flanco de los ratones BALB/c Rag2^{-/-}, en el día 0. Transcurridas 24 h, los ratones fueron anestesiados y se les administró D-luciferina (150 mg/kg, Biosynth) para la adquisición de imágenes y la cuantificación de la luminiscencia, permitiendo así una distribución equitativa de los ratones entre los diferentes grupos experimentales antes de la administración de los mAb. El mAb 91R o el mAb control isotípico IgG2b se inyectaron i.p. en los ratones (7 por grupo), en los días 1 (4 mg/kg) y 6 (2 mg/kg). Se realizaron 6 tomas de imágenes de luminiscencia hasta que los ratones fueron sacrificados, en el día 62 del ensayo, y los tumores fueron extraídos y pesados. Los ratones se anestesiaron con Imalgene 500 (2 ml/kg; Merial Laboratorios) y Xilagesic 2% (0,6 ml/kg; Laboratorios Calier) 10 min antes de cada análisis. La toma de imágenes se realizó con una cámara 1394 ORCA II ERG (Hamamatsu Photonics) en una cámara protegida de la luz durante 100 s. Se utilizó el software Wasabi (Hamamatsu Photonics) para cuantificar los resultados obtenidos y para generar las imágenes pseudocoloreadas.

14. Histología

Los tumores diseccionados se dividieron en dos mitades. Una mitad se embebió en Optimal Cutting Temperature Compound (O.C.T.) (Leica Microsystems) y se congeló instantáneamente en un baño de hielo seco con isopentano. Se almacenó a -80 °C, y se cortó en secciones de 8 µm. La otra mitad se fijó en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4) durante una noche, se lavó con PBS, se embebió en parafina y se cortó en secciones de 5 µm.

14.1 Hematoxilina-eosina

Las secciones embebidas en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina siguiendo procedimientos estándar y se montaron usando medio Micromount (Leica

Microsystems). Las imágenes se obtuvieron empleando un microscopio Zeiss Aixophot (Carl Zeiss) acoplado a una cámara Digital Sight (Nikon). El porcentaje de área necrótica de cada sección se cuantificó utilizando el programa NIH ImageJ.

14.2 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick end labelling)

Para analizar la muerte celular mediante TUNEL, las secciones de tumores xenogénicos embebidas en parafina se desparafinaron, rehidrataron, y se permeabilizaron (PBS-0,5% tritón X-100; 10 min, RT). Posteriormente se preincubaron con CoCl₂ 1 mM en tampón TdT pH 6,6 (Sigma; 15 min, en oscuridad, RT) y luego con la mezcla de reacción que contiene transferasa terminal recombinante y biotina-16-dUTP (Roche; 1h, 37 °C). A continuación las secciones se lavaron con tampón de preincubación (10 min, RT) y se detuvo la reacción con PBS-0,01% Tween 20. Finalmente, se añadió estreptavidina-Cy5 (Jackson ImmunoResearch; 1h, RT).

14.3 Tinción de PCNA

La proliferación celular se cuantificó por marcaje del antígeno de proliferación nuclear (PCNA) en secciones embebidas en parafina. Éstas se desparafinaron, rehidrataron e incubaron en tampón citrato de sodio pH 6,5 (15 min, en una cámara saturada de vapor de agua) para desenmascarar el antígeno. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo anti PCNA (una noche, 4°C, 2 µg/ml) empleando el kit de detección de fluorescencia MaxFluor Mouse on Mouse (Max Vision Biosciences).

14.4 Tinción de CD31

Los vasos sanguíneos en las secciones embebidas en OCT se tiñeron con el mAb anti CD31 de ratón. Las muestras se fijaron con acetona 100% (-20 °C, 10 min), se secaron al aire y se lavaron con tampón Tris salino (TBS). A continuación se bloquearon con TBS-0,5% BSA-2,5% suero de cabra (2 h, RT) y se tiñeron con anti CD31 (una noche, 4°C, 80 ng/ml). Se lavaron y revelaron con un anticuerpo anti Ig de rata marcado con Alexa Fluor 647.

14.5 Análisis de las imágenes

En todas las preparaciones los núcleos se tiñeron con 2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamida (DAPI) y se montaron con Fluoromont-G (Southern Biotech). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 (Leica Microsystems). Se adquirieron 5 planos focales por conjunto de planos o *stack* empleando un objetivo de 20 aumentos. Para cada tumor se analizaron un mínimo de tres secciones y entre 12 y 30 campos (elegidos al azar, no solapantes y no contiguos) por sección. La densidad por campo óptico de núcleos TUNEL o PCNA positivos y de fragmentos de vasos CD31 positivos se cuantificó empleando imágenes ampliadas usando el programa Count Tool de Adobe Photoshop.

15. Citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC)

Se aislaron células *natural killer* (NK) de bazo de ratones BALB/c utilizando el sistema de selección negativa Auto Macs Pro (Miltenyi). Las células purificadas se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su expresión de los marcadores celulares de ratón CD3, CD45 y CD49b. Todas las preparaciones utilizadas contenían al menos un 90% de células NK, definidas como aquellas con fenotipo CD3⁻/CD45⁺/CD49b⁺. Las células seleccionadas se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza) con 10% FBS y 1000 U/ml de IL-2 murina recombinante (Peprotech) durante 6-7 días antes de utilizarlas en los ensayos de citotoxicidad. Las células diana MOLT-4 se marcaron con Cell Trace CFSE (Life Technologies) y se preincubaron (30 min) con el mAb y concentración indicados. A continuación, las células NK y MOLT-4 se cocultivaron (4 h) en un ratio 20:1 (o el ratio indicado en cada figura) en medio RPMI-10% FBS; se tiñeron con el marcador de viabilidad celular por exclusión 7-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences; 10 min, 4°C) y se analizaron por citometría de flujo. El análisis del porcentaje de células 7-AAD⁺ dentro de la población de células marcadas en verde con CFSE permitió determinar la proporción de células diana muertas. La lisis específica se calculó como $100 \times (\% \text{ células diana muertas en la muestra} - \% \text{ células diana muertas de forma espontánea}) / (100 - \% \text{ células diana muertas de forma espontánea})$. Para determinar el nivel de muerte espontánea durante el ensayo se emplearon, como control, células diana incubadas en ausencia de células efectoras.

16. Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)

Las células MOLT-4 (10^5 células diana/100 μ l) fueron colocadas en placas de 96 pocillos con fondo en V (Nunc), incubadas con las concentraciones indicadas del mAb anti hCCR9 o de un mAb control isotópico (30 min, 37°C), centrifugadas y lavadas. A las células resuspendidas en medio DMEM-1% BSA se les añadió complemento de conejo (AbD Serotec; 25%, 1h, 37°C) activo o previamente inactivado por calor a 56°C. A continuación, las células se tiñeron con 7-AAD (BD Biosciences, 10 min, 4°C) y el número de células no viables se determinó por citometría de flujo. Cada condición del ensayo fue analizada por triplicado. La lisis específica se calculó como $100 \times (\% \text{ células muertas en presencia de complemento activo} - \% \text{ células muertas en la presencia de complemento inactivo}) / (100 - \% \text{ células muertas en la presencia de complemento inactivo})$.

17. PCR cuantitativa

17.1 Muestras

Las muestras de tumores ginecológicos humanos se obtuvieron tras obtener el consentimiento informado de los pacientes y en el contexto de un proyecto de investigación conjunto con el Dr. Daniel Martínez Campo del Servicio de Obstetricia y Ginecología y la Dra. Eugenia Bancalari Rojnica del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Torrejón. El proyecto fue evaluado y aprobado por parte de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario de Torrejón y del Comité de Ética CNB/CBMSO. Las muestras de tumores de colon y melanomas fueron cedidas por el Biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS integrado en la

Plataforma de la Red Nacional de Biobancos Hospitalarios (RetBioH) con la aprobación del Comité Científico de dicho hospital y del Comité de Ética de la Investigación conjunto del CNB-CBMSO/CSIC.

17.2 Extracción de RNA

Las distintas muestras se obtuvieron a partir de seis cortes de tejido de 10 µm de grosor. Las muestras de RNA de los tumores ginecológicos se extrajeron de bloques de tejido embebidos en parafina utilizando el kit Pure Link FFPE total RNA isolation kit (Invitrogen). Las muestras de RNA de los tumores de colon y melanomas se extrajeron de bloques de tejido congelado embebido en O.C.T. (Sakura). Para preservar la integridad del RNA, los cortes de tejido se introdujeron en un tubo eppendorf con 500 µl de RNeasy Lysis Buffer (Quiagen) inmediatamente después de su corte, se incubaron 30 min a RT y se congelaron a -80°C para su almacenamiento. Posteriormente, se extrajo el RNA utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen).

17.3 RT-qPCR

El RNA se transcribió a cDNA mediante el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). El cDNA resultante se amplificó empleando Fluocycle SYBR Green mix para PCR en tiempo real (EuroClone-Genycell) en un equipo ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron: (94 °C, 10 min) x 1; (94 °C, 15 s; 60 °C, 1 min) x 40. Una vez finalizada la qPCR, se realizó una curva de disociación del producto amplificado, para comprobar la ausencia de amplicones inespecíficos, contaminaciones o *primer dimers*. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa SDS 2.0.1. Las RT-qPCR se realizaron en triplicados y los resultados se normalizaron en función de los niveles de expresión del gen de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. La cantidad de RNA se expresa como cantidad relativa de RNA del gen problema respecto a la obtenida en una muestra control positivo.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para amplificar el cDNA de hCCR9 y hGAPDH mediante RT-qPCR

Oligonucleótido*	Nº NM	Secuencia 5'-3'
hCCR9-A Fw	NM_031200.2	GGGAGAGTTGCATCGCC
hCCR9-A Rv	NM_031200.2	GAATAGGGCTTGTGAAGTCTGTG
hCCR9-ABC Fw	NM_031200.2 NM_006641.3 NR_036525.1	TGTCCCAGGGAGAGTTGCAT
hCCR9-ABC Rv	NM_031200.2 NM_006641.3 NR_036525.1	GGAAGATGTGGATTCAGAGCCA
hGAPDH Fw	NM_002046.3	AGCCACATCGCTCAGACAC
hGAPDH Rv	NM_002046.3	GCCCAATACGACCAATCC

* Los oligonucleótidos se diseñaron mediante el programa Universal Human Probe Library de Roche.

18. Anticuerpos primarios

Tabla 7. Tabla de anticuerpos primarios utilizados

Antígeno	Tipo	Clon/Nombre (marcaje)	Referencia	Uso
hCCR9	mAb ratón (IgG2b)	91R	Nuestro laboratorio	WB (1 µg/ml) FC (1 µg/ml) ELISA (5-20 µg/ml)
hCCR9	mAb ratón (IgG2a)	92R	Nuestro laboratorio	FC (1 µg/ml) ELISA
hCCR9	mAb ratón (IgG2b)	3C3	ATCC [HB-12653]	FC (1 µg/ml) ELISA (5-20 µg/ml)
hCD3	mAb ratón (IgG1)	UCHT1 (FITC)	Beckman Coulter	FC (1:20)
hCD4*	mAb ratón (IgG1)	13B8.2 (PECy5)	Beckman Coulter	FC (1:10)
hCD8*	mAb ratón (IgG1)	B9.11 (PE)	Beckman Coulter	FC (1:200)
hCD71	pAb conejo	H-300	Santa Cruz Biotechnology	WB (0,4 µg/ml)
mCD3	mAb hámster (IgGκ)	145-2C11 (FITC)	Southern Biotech	FC (0,4 µg/ml)
mCD45	mAb rata (IgG2b)	30-F11 (PCy5)	Biolegend	FC (0,6µg/ml)
mCd49b	mAb rata (IgM)	DX5 (PE)	Biolegend	FC (1,2 µg/ml)
Células MOLT-4	pAb ratón	-	Nuestro laboratorio	CDC (1:1000)
hCD34	mAb ratón (IgG1)	8G12 (PerCP)	BD	FC (1:50)
hCD19	mAb ratón (IgG1)	SJ25C1 (Cy7)	BD	FC (1:50)
hCD5	mAb ratón (IgG1)	L17F12 (APC)	BD	FC (1:50)
hCD3	mAb ratón (IgG1)	UCHT1 (v500)	BD	FC (1:50)
hCD20	mAb ratón (IgG2b)	2H7 (PB)	Immunostep	FC (1:50)
hCD38	mAb ratón (IgG1)	HB7 (APC)	BD	FC (1:50)
hCD7	mAb ratón (IgG2a)	CD7-6B7 (APC)	Immunostep	FC (1:20)
hCD8**	mAb ratón (IgG1)	SK1 (APC)	BD	FC (1:20)
hCD4**	mAb ratón (IgG1)	RPA-T4 (PB)	BD	FC (1:50)
PCNA	mAb ratón (IgG2a)	PC10	Santa Cruz	IHC (2 µg/ml)
CD31	mAb rata (IgG2a)	MEC 13.3	BD	IHC (80 ng/ml)

* mAb empleado en la figura 7; ** mAb empleado en la figura 26

19. Anticuerpos control isotípico

Tabla 8. Tabla de anticuerpos utilizados como control isotípico

Isotipo (marcaje)	Especie	Clon/Nombre	Referencia	Uso
IgG2b	Ratón	PP5H10D10	Nuestro laboratorio	FC (1 µg/ml) ELISA (5-20 µg/ml)
IgG2a	Ratón	9F11E4G12	Nuestro laboratorio	FC (1 µg/ml) ELISA (5-20 µg/ml)
IgG1 (FITC)	Ratón	15H6	Southern Biotech	FC (1:2)
IgG1 (Pcy5)	Ratón	15H6	Southern Biotech	FC (1:2)
IgG2b (PE)	Ratón	X40	Becton Dickinson	FC (1:2)
IgG (FITC)	Hámster	0121-02	Southern Biotech	FC (0,4 µg/ml)
IgG2b (Pcy5)	Rata	0118-15	Southern Biotech	FC (0,6 µg/ml)
IgGM (PE)	Rata	0120-09	Southern Biotech	FC (1,2 µg/ml)

20. Anticuerpos secundarios

Tabla 9. Tabla de anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Especie	Referencia	Uso
Anti IgG (H+L) de ratón-HRP	Cabra	Dako (P0447)	WB (1:1500) ELISA (1:1500)
Anti IgG (H+L) de ratón-PE	Cabra	Beckman Coulter (731856)	FC (1:1000)
Anti IgG1 de ratón-HRP	Cabra	Southern Biotech (1070-05)	FC (1 µg/ml) ELISA (5-20 µg/ml)
Anti IgG2a de ratón-HRP	Cabra	Southern Biotech (1080-05)	ELISA (1:1000)
Anti IgG2b de ratón-HRP	Cabra	Southern Biotech (1090-05)	ELISA (1:1000)
Anti IgG3 de ratón-HRP	Cabra	Southern Biotech (1100-05)	ELISA (1:1000)
Anti IgM de ratón-HRP	Cabra	Southern Biotech (1020-05)	ELISA (1:1000)

21. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 4. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$, utilizando el test t- Student de dos colas. Los resultados se muestran como la media \pm SEM.

Resultados

1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente al receptor de quimioquinas humano CCR9

1.1 Generación de mAb frente al receptor de quimioquinas hCCR9

La complejidad estructural de los receptores de quimioquinas, con siete dominios embebidos en la membrana celular, hace que sea particularmente difícil su solubilización y la obtención de las cantidades necesarias, en conformación nativa, para poder abordar un proceso de inmunización. En el laboratorio se realizaron varios intentos previos de inmunización de ratones, con el objetivo de generar una buena respuesta inmune frente a hCCR9, empleando péptidos sintéticos y células HEK-293 transfectadas de manera estable con hCCR9. En ninguno de estos experimentos se obtuvieron anticuerpos específicos frente a hCCR9. Por esta causa, se decidió utilizar por una estrategia de inmunización génica para la generación de mAb murinos frente a hCCR9.

Para la inmunización, se emplearon partículas de oro recubiertas de un vector de expresión de hCCR9. Estas se dispararon sobre la piel de cada ratón, los días 0 y 30 de la pauta de inmunización (**Fig. 6**). La inoculación mediante pistola génica introduce el plásmido de expresión de hCCR9 directamente en el citosol de las células de la piel del ratón, incluyendo queratinocitos y células presentadoras de antígeno. Una vez en el interior celular, comienza la expresión de la proteína de interés. Tras su adecuado procesamiento y presentación a las células del sistema inmune, se genera una respuesta inmune tanto a través de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) vía MHC-I, como por linfocitos T cooperadores (CD4⁺) vía MHC-II, así como de tipo humoral (Cohen et al., 1998).

El día 45, se extrajeron muestras de sangre de los seis ratones inmunizados y se determinó, mediante citometría de flujo, el título de anticuerpos anti hCCR9 presentes en el suero de los ratones. Para estos análisis, se emplearon células HEK-hCCR9 transfectadas de forma estable y, como control negativo, células HEK-pCIneo. De este modo, se seleccionaron los tres ratones que mostraron un mejor título de anticuerpos anti hCCR9, y se procedió a estimular la proliferación de las células B específicas mediante dos inyecciones de células HEK-hCCR9 en los días 57 y 58 de la inmunización.

Finalmente, el día 60 de la inmunización se sacrificaron los tres ratones seleccionados y sus bazo se extrajeron y disgregaron en condiciones de esterilidad. Los esplenocitos se fusionaron con células del mieloma de ratón P3-X63.Ag8.653. Las células de este mieloma se caracterizan por su capacidad de crecer indefinidamente en cultivo celular y por no sintetizar Ig. Las células P3-X63.Ag8.653 son deficientes en la enzima HGPRT, implicada en la vía de recuperación de ácidos nucleicos. Los productos de la fusión celular se clonaron en un medio selectivo que contenía hipoxantina y azaserina. La azaserina es un inhibidor de la síntesis *de novo* de purinas y la hipoxantina es precursora de la ruta de recuperación de los mismos. De modo que tan sólo aquellas células resultantes de la fusión entre un linfocito, capaz de emplear la hipoxantina para sintetizar nucleótidos, y una célula de mieloma, capaz de dividirse ilimitadamente en cultivo, sobreviven en este medio selectivo.

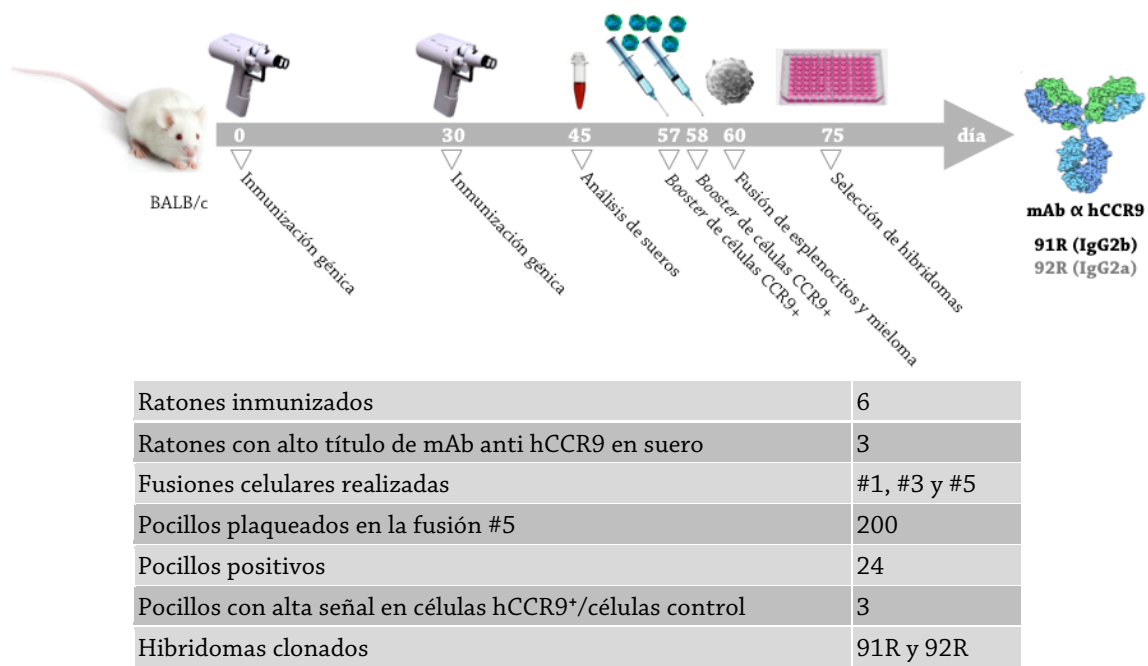


Figura 6. Esquema del protocolo de inmunización génica utilizado para la generación de anticuerpos anti hCCR9 y los principales resultados obtenidos.

Los anticuerpos murinos anti hCCR9 se generaron mediante inmunización con pistola génica, empleando partículas de oro recubiertas con un plásmido de expresión de hCCR9. Tras un primer análisis de la presencia de anticuerpos en los sueros de ratón, se seleccionaron los ratones con mejor título de anticuerpos anti hCCR9. Se administraron dos dosis de recuerdo (*booster*), mediante la inoculación de células HEK-293 transfectadas con hCCR9 y se realizaron fusiones celulares de los esplenocitos de los ratones inmunizados con células de mieloma, utilizando PEG como agente fusogénico. Las células se plaquearon en medio selectivo y se emplearon muestras del medio condicionado por el crecimiento de los hibridomas para identificar aquellos productores de anticuerpos específicos frente a hCCR9.

La producción de anticuerpos específicos anti hCCR9 por los distintos hibridomas resultantes fue analizada 75 días después de la fusión. Los medios de cultivo condicionados por el crecimiento de los distintos clones se analizaron mediante citometría de flujo, de forma análoga a la utilizada para la titulación de los sueros de ratón, utilizando células HEK-293 transfectadas con pCIneo-hCCR9 y con pCIneo-vacío como control. De esta forma, se identificaron tres pocillos con hibridomas productores de mAb específicos frente a hCCR9, que se seleccionaron para su clonación. Dos de estos hibridomas mantuvieron la producción de Ig después de una serie de tres ciclos de clonación. Cada ciclo fue seguido de un control por citometría de flujo de la presencia de mAb anti hCCR9 en el medio de cultivo condicionado. Los clones resultantes se denominaron 91R y 92R.

Los mAb secretados al medio condicionado se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columnas de proteína G acoplada a sefarosa. El isotipo de los mAb purificados se analizó mediante ELISA, determinándose que 91R es de isotipo IgG2b y 92R de isotipo IgG2a.

1.2 Estudio de la especificidad de los mAb anti hCCR9

Con el fin de analizar la especificidad de 91R por hCCR9, empleamos células HEK-293 transfectadas de manera estable con un vector de expresión de hCCR9, de otros receptores relacionados, o con el vector pCIneo vacío. CCR9 humano y murino tienen una identidad de secuencia del 86% de sus aa, sin embargo, 91R sólo reconoce las células que expresan CCR9 humano (**Fig. 7A**). 91R tampoco se une de forma detectable a células que expresan los receptores de quimioquinas humanos hCCR4, hCCR5, hCCR6 o hCCR8, que comparten entre un 33 y un 39% de identidad de secuencia con hCCR9, confirmando que este mAb reconoce a hCCR9 de forma específica.

Las líneas celulares humanas de leucemia linfocítica aguda de células T MOLT-4 y Jurkat se utilizaron para analizar la capacidad de unión de 91R al receptor hCCR9 expresado de manera endógena. Conforme a lo indicado en la bibliografía, las células MOLT-4 expresan hCCR9 y son reconocidas por el mAb 3C3 específico de hCCR9; mientras que las células Jurkat no lo expresan (Yu et al., 2000; Zabel et al., 1999). El mAb 91R se une en citometría de flujo a células MOLT-4, mientras que no reconoce a células Jurkat (**Fig. 7B**).

En paralelo, se estudió la capacidad de reconocimiento por el mAb 91R de CCR9 endógeno, expresado en células humanas primarias no tumorales. Este receptor se expresa principalmente en las células T (Youn et al., 1999; Zaballos et al., 1999; Zabel et al., 1999). Mediante citometría de flujo, se analizaron timocitos humanos observándose un patrón de expresión de CCR9 similar al descrito previamente para timocitos de ratón (Carramolino et al., 2001). El análisis con el mAb 91R demostró que sólo una fracción de timocitos inmaduros dobles negativos expresan este receptor, mientras que prácticamente el 100% de los timocitos CD4⁺CD8⁺ lo expresan. Además, las poblaciones de células CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺ presentan un nivel menor de expresión de hCCR9, que varía a largo de su diferenciación y maduración (**Fig. 7C**). También de forma consistente con la bibliografía (Zabel et al., 1999), el análisis de leucocitos de sangre periférica mostró que solamente un pequeño porcentaje de linfocitos en sangre, entre un 3 y un 4%, expresan hCCR9, y que éstos son predominantemente células CD3⁺ (**Fig. 7D**).

La especificidad de unión del mAb 91R a CCR9 se confirmó mediante el silenciamiento de la expresión de este receptor, utilizando células MOLT-4 transducidas con partículas lentivirales portadoras de moléculas de shRNA. Las células MOLT-4 sin tratar, o tratadas con un shRNA control, presentaron una elevada intensidad de señal de fluorescencia tras la incubación con el mAb 91R. Por el contrario, en las células tratadas con un shRNA diseñado para el silenciamiento de hCCR9, la unión de 91R disminuye fuertemente, observándose hasta un 70% \pm 2,3% de reducción de la señal, confirmando así la reducción del nivel de expresión de CCR9 (**Fig. 8A**). El silenciamiento específico de CCR9 se confirmó a nivel transcripcional, mediante RT-qPCR (**Fig. 8B**) y a nivel funcional, mediante ensayos de migración y de movilización de calcio intracelular en respuesta a CCL25 (**Fig. 8C y D**).

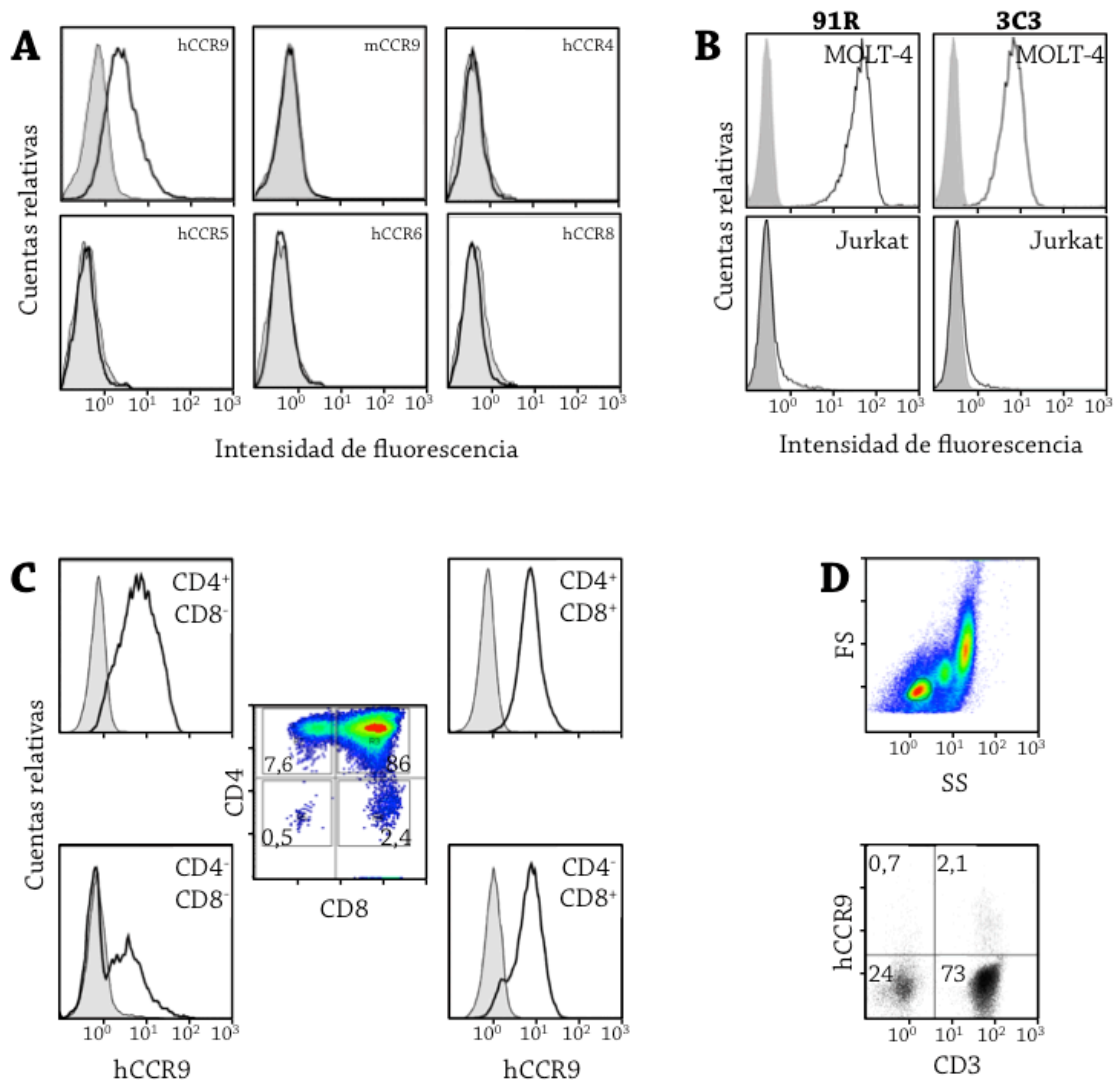


Figura 7. El mAb 91R reconoce de manera específica al receptor de quimioquinas CCR9 humano.

(A) Tinción con el mAb 91R y análisis por citometría de flujo de células HEK-293 transfectadas de manera estable con hCCR9, mCCR9, hCCR4, hCCR5, hCCR6 o hCCR8 (histogramas vacíos) o el vector pCIneo vacío (histogramas coloreados). (B) Células de leucemia MOLT-4 y Jurkat, teñidas con los mAb anti CCR9 humano 91R y 3C3 (histogramas vacíos), o con un mAb control isotópico (histogramas coloreados); y analizadas por citometría de flujo. (C) Timocitos humanos marcados con anti CD4, anti CD8 y 91R y analizados por citometría de flujo. Se muestra el histograma biparamétrico CD4/CD8 indicando los porcentajes de células positivas en cada *gate*; y la expresión de hCCR9 en cada subpoblación. (D) Análisis por citometría de flujo de células de sangre periférica teñidas con 91R y anti-CD3. Se muestra la población celular total y la tinción CD3/91R de la población de linfocitos.

Por último, la especificidad de 91R se estudió en ensayos de electroforesis en condiciones desnaturizantes seguidos de análisis por inmunotransferencia. Se utilizaron extractos de membrana de células HEK-293 transfectadas con el vector pCIneo o pCIneo-hCCR9 y de células MOLT-4. Para analizar si 91R reconocía la secuencia primaria de hCCR9 o si se unía a carbohidratos presentes en el receptor, una parte de los extractos se trató con la N-glicosidasa PNGasa F. En los extractos sin tratar, 91R reconoce de manera específica una banda de 43 kDa en células HEK-hCCR9

(célula de riñón) y una banda mayoritaria de 47 kDa en células MOLT-4 (linfocito T) (**Fig. 9**). La diferencia de peso molecular aparente podría deberse a una glicosilación específica de cada tipo celular. En los extractos tratados con PNGasa F se detectó, en los dos tipos celulares, una única banda de peso molecular aparente algo superior a 40 kDa, consistente con el peso molecular estimado para hCCR9 (369 aa; PM_{estimado} : 42.016 Da; ExPASy-Compute pI/Mw tool). Estos resultados demuestran, por primera vez, la N-glicosilación de hCCR9, que había sido propuesta para la posición Asn32 de hCCR9-A (Zaballos et al., 1999); y que dicho motivo de N-glicosilación no forma parte del epítipo reconocido por 91R, sugiriendo que este mAAb se une al esqueleto peptídico de hCCR9.

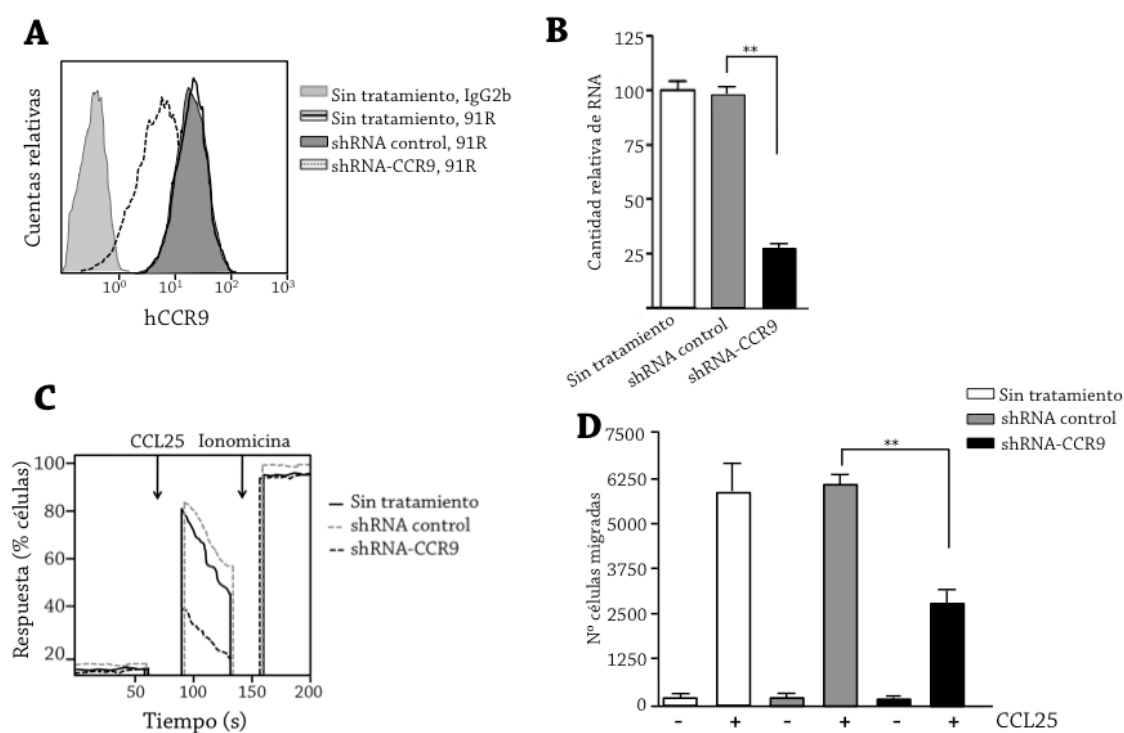


Figura 8. Las células MOLT-4 tratadas con shRNA-CCR9 presentan menor unión del mAAb 91R, movilización de calcio intracelular y capacidad de migración en respuesta a CCL25.

Estudio de células MOLT-4 sin tratar o infectadas con lentivirus que contiene un shRNA control o shRNA-CCR9 **(A)** Análisis mediante RT-qPCR de la expresión relativa de CCR9 ($n = 4$). **(B)** Tinción con el mAAb 91R o mAAb control isotípico y análisis por citometría de flujo ($n = 4$). **(C)** Ensayo de movilización de calcio. Las células se incubaron con el colorante fluorescente Fura-03 AM, que une calcio libre intracelular. A continuación, se estimularon con CCL25 (50 nM) y la fluorescencia generada por la liberación de calcio en el citosol se monitorizó mediante citometría de flujo. Los datos representan la media \pm SEM de triplicados ($n = 3$). **(D)** Quimiotaxis inducida por CCL25. Se plaquearon 3×10^5 células en insertos de cámaras Transwell y se permitió su migración hacia la cámara inferior en presencia o ausencia de CCL25 (200 nM) durante 3 h. El número de células que migraron se determinó mediante citometría de flujo. Los datos representan la media \pm SEM de triplicados ($n = 3$). Test t-Student *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

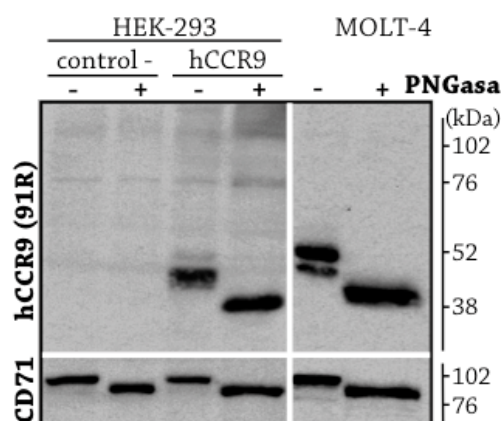


Figura 9. El mAb 91R reconoce un epítipo peptídico de hCCR9.

Análisis por electroforesis e inmunotransferencia de lisados celulares enriquecidos en membranas de células HEK-293 transfectadas con pCIneo o con pCIneo-hCCR9, y de células MOLT-4, revelado con el mAb 91R. Para el control de carga se utilizó un mAb anti CD71. Donde se indica (+), los lisados fueron tratados con PNGase F para eliminar carbohidratos en sitios de N-glicosilación (n = 2).

1.3 Análisis de la unión del mAb 91R a CCR9 en presencia de CCL25 y del efecto de 91R sobre la migración celular inducida por CCL25

Con el objetivo de determinar si el mAb 91R y CCL25 compiten por su unión a CCR9, se analizó mediante citometría de flujo la unión de 91R a células MOLT-4 preincubadas con la quimioquina CCL25 o con la quimioquina CXCL12, utilizada como control negativo. Este ensayo no pudo realizarse en el sentido contrario, debido al alto nivel de unión inespecífica de CCL25 a células que no expresan CCR9. Todos los pasos de incubación se llevaron a cabo a 4°C y en la presencia de azida de sodio, para evitar la internalización del receptor. A continuación, se incubaron las células con el mAb 91R y se analizó su capacidad de unión mediante citometría de flujo. Como puede observarse en la **figura 10A**, la unión de 91R a las células fue parcialmente inhibida por la presencia de CCL25 y no por la de CXCL12. Este resultado sugiere que el lugar de unión de la quimioquina a CCR9 y el epítipo reconocido por 91R podrían solaparse parcialmente o estar muy próximos entre sí. Otra posible explicación sería que la unión de CCL25 al receptor podría provocar un cambio conformacional en el epítipo de CCR9 reconocido por 91R que dificulte su reconocimiento por este mAb.

Para analizar si la unión de 91R interfiere en la señalización intracelular inducida por CCL25, se llevaron a cabo ensayos de migración celular en cámaras *Transwell*. La preincubación con el mAb 91R no bloqueó la migración de células MOLT-4 en respuesta a un gradiente de concentración de la quimioquina CCL25 (**Fig. 10B**). La migración de células MOLT-4 preincubadas con 91R fue similar a la observada en células preincubadas sin mAb o con un mAb control isotípico. Por el contrario, la preincubación con el mAb 3C3 anti hCCR9, empleado como control positivo, inhibió un $67,2 \pm 1,4\%$ la migración, de forma consistente con la bibliografía (Zabel et al., 1999). Estos datos indican que la unión de 91R a CCR9 no interfiere en la capacidad de CCL25 de transducir señales a través del receptor, al menos de vías de señalización necesarias para la migración celular.

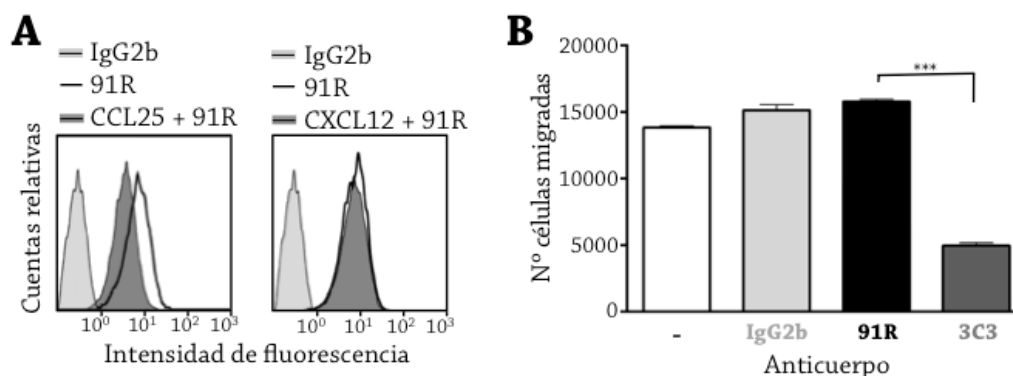


Figura 10. La quimioquina CCL25 inhibe parcialmente la unión de 91R a células CCR9⁺. El mAb 91R no bloquea la señalización del eje CCL25/CCR9.

(A) Análisis mediante citometría de flujo de la competición de CCL25 por la unión de 91R a células MOLT-4. Las células se preincubaron con tampón salino o con la quimioquina indicada (10 µg/ml) y posteriormente se tiñeron con 91R o un mAb control isotópico. (n = 3). **(B)** Efecto de los mAb anti hCCR9 91R y 3C3 en la migración de células MOLT-4. Se plaquearon 3×10^5 células previamente preincubadas con el mAb indicado (100 µg/ml) en insertos de cámaras Transwell de 5 µm. Se permitió la migración celular hacia la cámara inferior en presencia de CCL25 (200 nM) durante 3 h y, a continuación, el número de células que habían migrado se determinó mediante citometría de flujo. Se muestra la media ± SEM de un experimento representativo de tres realizados. Test t-Student *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05.

1.4 Competición de los mAb 91R y 92R por su unión a un epítipo presente en el dominio amino terminal de hCCR9

De manera análoga a 91R, el segundo mAb anti hCCR9 identificado, denominado 92R, demostró ser específico frente al receptor de quimioquinas humano CCR9. En ensayos de citometría de flujo, 92R solamente se unió a células MOLT-4, y no a células Jurkat (**Fig. 11A**). Con el fin de determinar si 91R y 92R se unen a epítopos independientes de hCCR9 o compiten entre sí, se realizaron ensayos de competición. Para ello, se preincubaron las células MOLT-4 con cada uno de los siguientes mAb sin marcar: anti hCCR9 3C3, 91R y 92R o un mAb control negativo. A continuación, se añadió uno de los mAb anti hCCR9 marcados con biotina. Después de una etapa de lavado, el ensayo se reveló utilizando estreptavidina marcada con un fluorocromo. El mAb control no interfirió en la unión a MOLT-4 de ninguno de los tres mAb anti hCCR9 biotinilados. Por otra parte, el mAb 3C3 únicamente inhibió su propia unión, bloqueando al mAb 3C3-Biot. Sin embargo, 91R interfiere en la unión de 91R-Biot y de 92R-Biot a hCCR9; y a la inversa, 92R interfiere en la unión de 91R-Biot y 92R-Biot. Estos resultados sugieren que los epítopos de hCCR9 reconocidos por 91R y por 92R están muy próximos o solapados entre sí (**Fig. 11B**).

Dado que el mAb 91R reconoce al receptor hCCR9 expuesto en la superficie de células no permeabilizadas, el correspondiente epítipo debía localizarse en alguno/s de los dominios extracelulares de hCCR9. Además, los resultados de ensayos de inmunotransferencia demostraron que 91R reconoce al receptor desnaturalizado y N-desglicosilado. Con el fin de identificar qué regiones de la secuencia primaria forman

parte del epítipo reconocido por 91R, se realizaron ELISA de captura de anticuerpo, utilizando diferentes péptidos sintéticos unidos a la placa. Se sintetizaron péptidos correspondientes a las regiones extracelulares de hCCR9, cubriendo el dominio N-terminal y los *loops* extracelulares EC1, 2 y 3. El mAb 91R reconoció de forma específica a un péptido correspondiente a las posiciones de aa 2-22 del dominio N-terminal de la isoforma A de hCCR9. Se observó que 91R y 92R compiten por su unión a dicho péptido (**Fig. 11C**). Estos resultados muestran que estos dos mAb podrían interactuar con un epítipo perteneciente al esqueleto peptídico de hCCR9. Concretamente, dicho epítipo estaría comprendido entre los aa 2-22 de la molécula, pertenecientes al dominio N terminal de hCCR9.

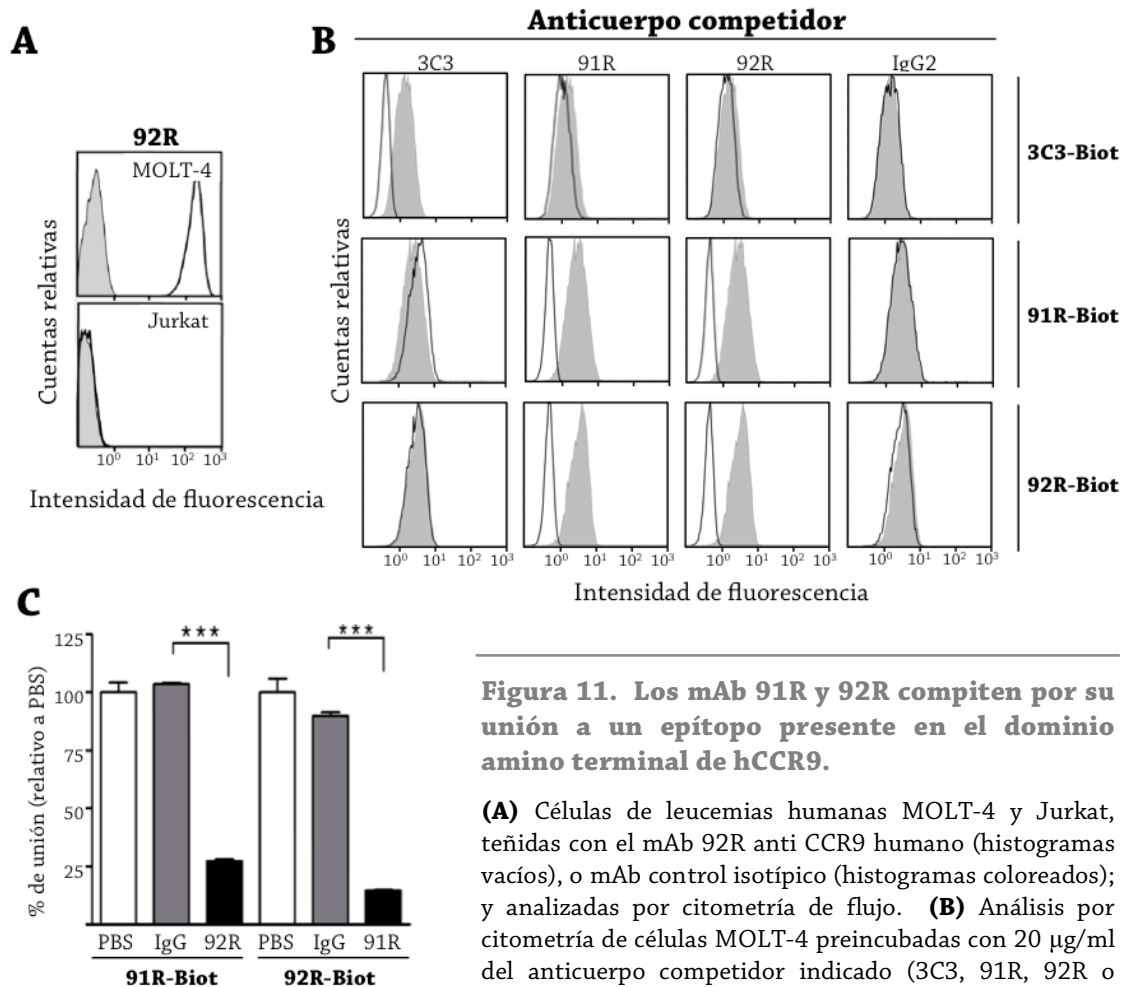


Figura 11. Los mAb 91R y 92R compiten por su unión a un epítipo presente en el dominio amino terminal de hCCR9.

(A) Células de leucemias humanas MOLT-4 y Jurkat, teñidas con el mAb 92R anti CCR9 humano (histogramas vacíos), o mAb control isotípico (histogramas coloreados); y analizadas por citometría de flujo. **(B)** Análisis por citometría de células MOLT-4 preincubadas con 20 µg/ml del anticuerpo competidor indicado (3C3, 91R, 92R o IgG2b control), teñidas con 1 µg/ml del anticuerpo anti

hCCR9 marcado con biotina que se indica en cada caso (3C3-Biot, 91R-Biot o 92R-Biot) y estreptavidina-FITC. Se muestra un experimento representativo (n = 2). **(C)** ELISA de competición en el que se utilizó un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 2-22 de hCCR9-A unido a la placa. Tras una incubación con PBS, IgG control, 91R o 92R; se añadió 91R-Biot o 92R-Biot según el caso. A continuación, la placa se reveló con estreptavidina-HRP. Se muestra la media ± SEM de un experimento representativo (n = 3). Test t-Student, *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05.

1.5 Análisis de las constantes cinéticas y de afinidad de la interacción de los mAb 91R y 92R con un péptido correspondiente a los aa 2-22 de hCCR9-A

Con el objetivo de caracterizar y comparar la afinidad de los mAb 91R y 92R frente al epítipo presente en el péptido sintético hCCR9(2-22), se realizaron ensayos de interacción péptido-mAb utilizando un biosensor basado en el fenómeno óptico de resonancia de plasmón de superficie. Este tipo de biosensores pueden detectar interacciones entre biomoléculas sin necesidad de marcaje y en tiempo real, permitiendo un análisis cuantitativo de la interacción.

En primer lugar se inmovilizó de forma covalente el péptido hCCR9(2-22) sobre la superficie de un chip CM5. Con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de inmovilización, se realizaron ensayos previos de preconcentración electrostática. El péptido se diluyó en un tampón con baja fuerza iónica, acetato de sodio 20 mM, a un pH por debajo de su punto isoelectrico (pI 3,37). Se probaron distintas concentraciones de péptido y también dos tampones con diferente pH. El mejor nivel de preconcentración electrostática se obtuvo a una concentración de péptido de 75 µg/ml a pH 3,0. Una vez establecidas las condiciones, se procedió a inmovilizar el péptido a través de su extremo N-terminal sobre la superficie del canal 2 del *sensor chip*, previamente activada con EDC y NHS. A continuación, se inactivó la superficie con etanolamina-HCl. Como canal de referencia se empleó el canal 1, situado en primer lugar, el cual fue sometido al mismo tratamiento de activación/desactivación, pero en ausencia de ligando, con el objetivo de reducir una posible unión inespecífica del analito a la superficie del chip. El nivel de inmovilización obtenido fue reducido, debido al bajo pI del ligando, pero fue adecuado para llevar a cabo los estudios cinéticos y de afinidad al equilibrio.

A continuación, se estudió la interacción entre los distintos mAb purificados y el péptido inmovilizado. En la **figura 12** se representan las señales procesadas de SPR obtenidas al inyectar una serie de concentraciones de los mAb anti hCCR9. Las muestras se inyectaron durante 3 min (tiempo de asociación), tiempo suficiente para alcanzar el estado de equilibrio en las diferentes concentraciones de mAb utilizadas. Una vez alcanzado el equilibrio, se inyectó el tampón sin mAb para estudiar la disociación de cada mAb durante otros 3 min (tiempo de disociación), suficiente para calcular la constante de velocidad disociación.

Los resultados correspondientes a las distintas concentraciones de cada mAb, fueron procesados y los datos obtenidos se ajustaron a un modelo de interacción 1:1 (Langmuir), que permitió el cálculo de las constantes de la velocidad de asociación (k_a) y de disociación (k_d) de los mAb 91R y 92R. La constante de disociación al equilibrio (K_D) de 91R y 92R se calculó de dos maneras diferentes, a partir de las constantes cinéticas y a partir de las RU obtenidas en el estado de equilibrio durante la fase de asociación. En ambos casos, el mAb 91R presentó una afinidad aparente ligeramente mayor que 92R. Los valores estadísticos calculados se muestran en la **tabla 10**.

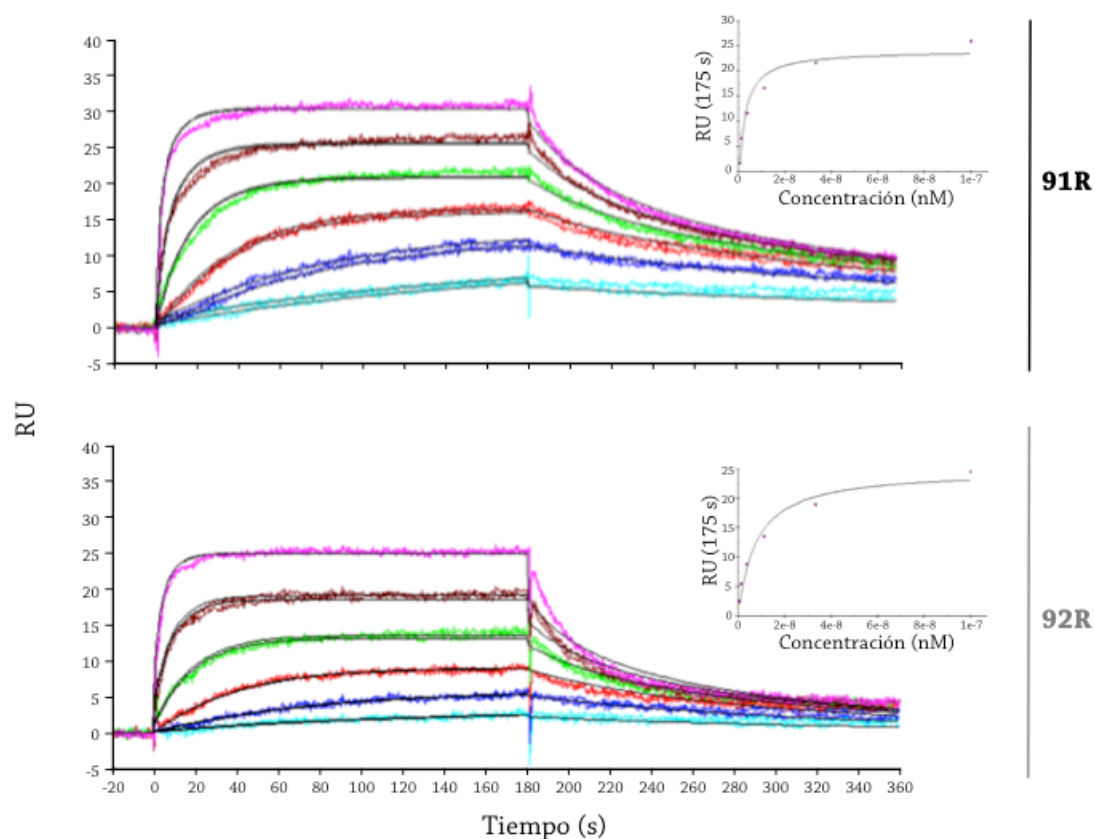


Figura 12. El mAb 91R se une al péptido correspondiente a los aa 2-22 de hCCR9-A con una afinidad ligeramente mayor que la del mAb 92R.

Se inmovilizó un péptido sintético correspondiente a los aa 2-22 de hCCR9-A en la superficie de un chip recubierto por una capa de carboximetil dextrano, mediante acoplamiento a través de grupos amino. A continuación, se inyectaron diferentes concentraciones de los mAb 91R y 92R (0,41; 1,23; 3,7; 11,1; 33,3 y 100 nM). Se muestran las unidades de resonancia (RU) obtenidas para las diferentes concentraciones de mAb inyectadas por duplicado. Las curvas en color negro muestran el ajuste global de los datos de cada sensograma a un modelo de interacción 1:1. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

Tabla 10. Constantes cinéticas y de afinidad para la interacción entre los mAb anti CCR9 y el péptido hCCR9 (2-22)

mAb	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)*	K_d (s^{-1})	K_D (M)**	χ^2
91R	$5,6 \times 10^6$ [191]	$5,2 \times 10^3$ [229]	$0,9 \times 10^{-9}$	1,7
92R	$3,8 \times 10^6$ [133]	$8,7 \times 10^3$ [215]	$2,3 \times 10^{-9}$	0,9

* Los números entre corchetes representan el valor T, que se obtiene dividiendo el parámetro correspondiente por su error estándar. Como regla general, valores mayores de 10 indican que los valores obtenidos para el parámetro son significativos.

** K_D fue calculada a partir del estado estacionario.

1.6 Identificación mediante un panel de péptidos del epítipo mínimo reconocido por los mAb 91R y 92R en la secuencia primaria de hCCR9

Los resultados de los ensayos de competición por ELISA y de las interacciones péptido-mAb estudiadas mediante SPR demostraron que 91R y 92R se unen a epítipos idénticos, o muy próximos, dentro de la molécula de hCCR9 y con afinidades aparentes similares. Como se indicó anteriormente, los dos mAb anti hCCR9 reconocen al péptido sintético hCCR9(2-22). Con el fin de identificar el epítipo concreto de hCCR9 reconocido por cada uno de estos mAb, se realizaron ensayos de interacción utilizando un conjunto de péptidos sintéticos, mediante la técnica denominada Pepscan. Este ensayo permite identificar el epítipo lineal mínimo de un antígeno, es decir, la secuencia de aa que resulta necesaria y suficiente para que se produzca la unión del mAb.

Se sintetizó sobre una membrana un panel de péptidos de 12 aa, solapantes 10 aa entre sí, y que en conjunto cubren la secuencia completa de hCCR9-A. Cada péptido se sintetizó sobre una pequeña área circular, de forma automática, por conjugación secuencial de aa protegidos a la membrana a partir de sus extremos carboxilo, utilizando protocolos Fmoc.

Las membranas conteniendo el conjunto de péptidos correspondientes a hCCR9 se bloquearon, se incubaron con el mAb 91R o 92R, seguido de un anticuerpo secundario acoplado a HRP y se revelaron con ECL. De esta forma se identificaron cuatro péptidos, localizados de forma contigua en las membranas, que resultaron ser los únicos reconocidos tanto por 91R como por 92R (**Fig. 13A**). La secuencia de aa común a esos cuatro péptidos se muestra en la figura, y se considera el mínimo epítipo de hCCR9 necesario para que se produzca la interacción con 91R y con 92R. Dicha secuencia corresponde a los aa de las posiciones 11-16 de la secuencia de hCCR9 isoforma A (**Fig. 13B**). La secuencia identificada forma parte del dominio amino terminal de hCCR9, orientado hacia el exterior celular (**Fig. 13C**).

El análisis mediante Pepscan permitió demostrar que 91R y 92R se unen a una misma región de hCCR9, así como identificar los aa de hCCR9 necesarios para que se produzca dicha unión.

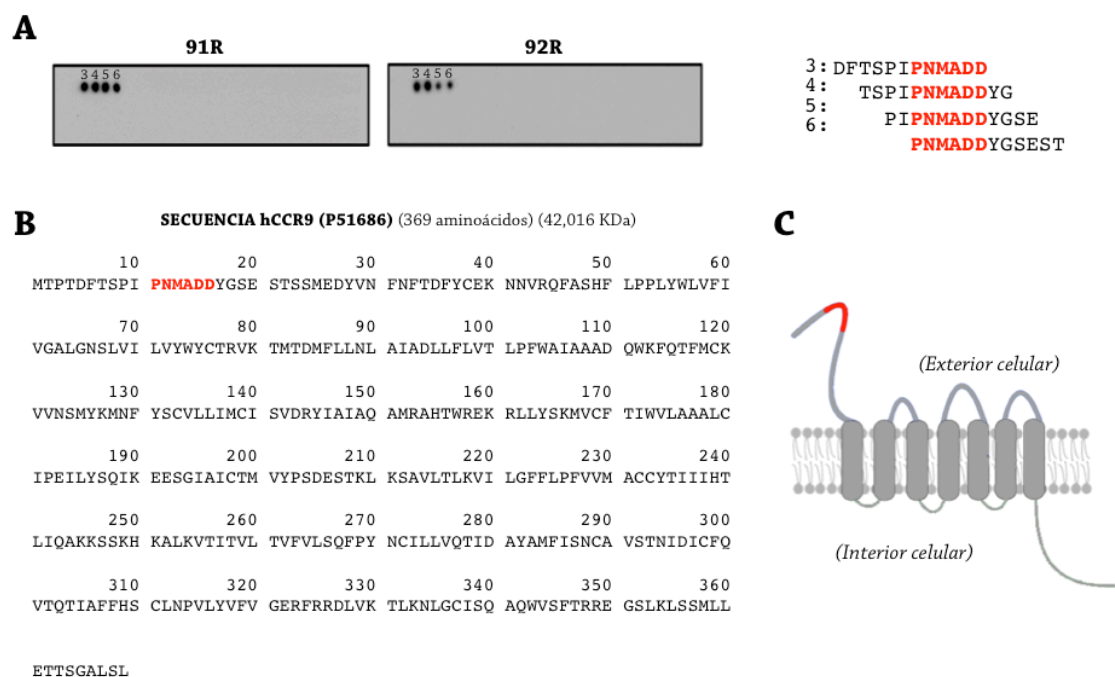


Figura 13. El epítipo mínimo reconocido por los anticuerpos 91R y 92R está formado por seis aa, correspondientes a las posiciones 11-16 de la isoforma A de hCCR9.

(A) Se utilizó la técnica Pepsan para identificar el epítipo de hCCR9 reconocido por los mAb 91R y 92R. Sobre una membrana de celulosa se sintetizaron 180 péptidos de 12 aa, solapados 10 aa entre sí, que cubren toda la secuencia de hCCR9-A. La membrana fue incubada con el mAb 91R o 92R y posteriormente revelada con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y ECL (n=2). Las secuencias de los 4 péptidos reconocidos por 91R y 92R se muestran a la derecha, y el epítipo mínimo reconocido (la secuencia de aa presente en esos cuatro péptidos) se ha resaltado en rojo. **(B)** Secuencia completa de la isoforma A de la proteína hCCR9, con los residuos necesarios para la unión de 91R y 92R resaltados en rojo. **(C)** Esquema del receptor hCCR9-A embebido en la membrana plasmática, con la posición del epítipo reconocido por 91R y 92R en rojo.

1.7 Caracterización de los aa de hCCR9 relevantes para la interacción entre los mAb 91R y 92R y el receptor

Una vez identificado el epítipo mínimo de hCCR9 reconocido por 91R y por 92R, se analizó la contribución de cada uno de los aa de dicho epítipo a la unión entre los mAb y el receptor. Para ello, se realizó una nueva síntesis de péptidos sobre membranas de celulosa. En esta ocasión, el conjunto de péptidos sintetizados se basó en variaciones de la secuencia de un péptido sintético correspondiente a los aa 8-19 de hCCR9. Cada uno de los péptidos del conjunto tiene una de las posiciones del epítipo mínimo de reconocimiento (aa 11-16) sustituida por cada uno de los restantes aa proteinogénicos, manteniendo el resto de posiciones inalteradas. Este abordaje permitió identificar qué aa y mediante qué tipo de interacciones contribuyen en mayor medida a la unión entre los mAb y hCCR9.

En la **figura 14A** se muestra la cuantificación densitométrica de la señal obtenida en cada área de las membranas (correspondiente a un péptido), tras ser incubadas con 91R o 92R y reveladas con un anticuerpo secundario acoplado a HRP y ECL. Se

consideró el 100% la intensidad de la señal obtenida con el péptido correspondiente a la secuencia original de hCCR9. La intensidad obtenida para los demás péptidos se representa como un porcentaje respecto a dicha señal.

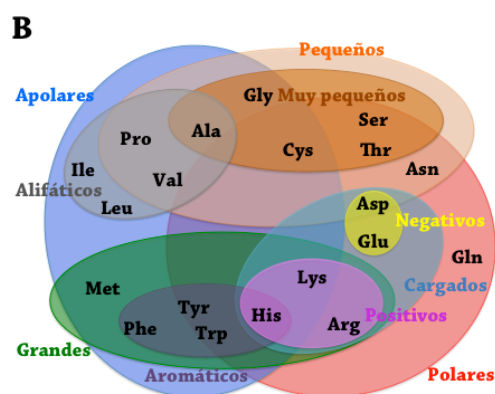
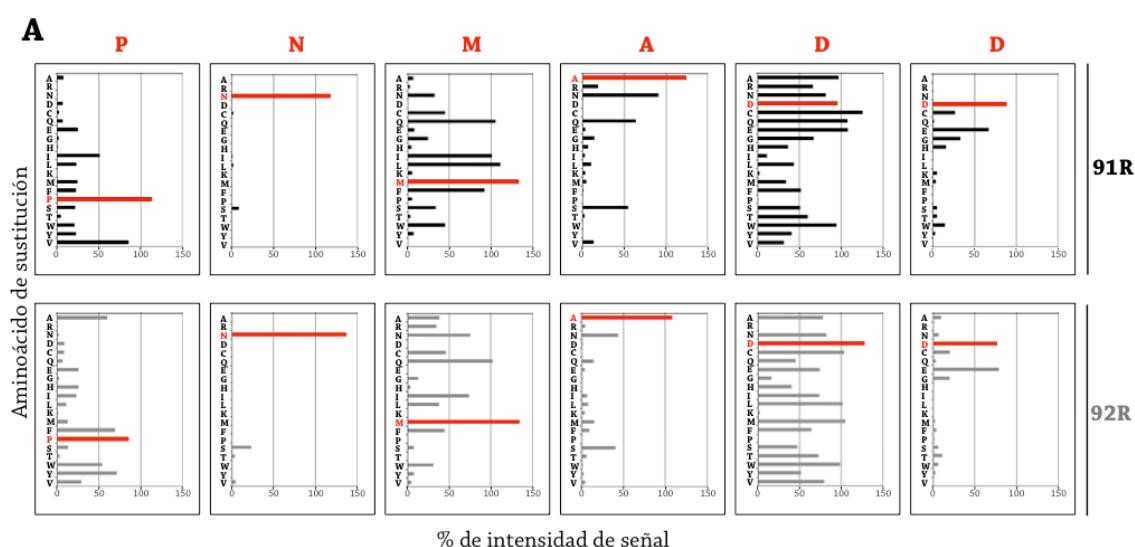


Figura 14. Los aa N12 y D16 de hCCR9-A son esenciales para que se produzca la interacción entre los mAb 91R o 92R y el receptor.

(A) Análisis mediante Pepscan en el que se utilizan péptidos sintéticos correspondientes a las posiciones 8-19 de la isoforma A de hCCR9 sintetizados sobre una membrana. En cada caso, una de las seis posiciones del epítipo mínimo hCCR9(11-16) reconocido por los mAb 91R y 92R fue sustituida por cada uno de los otros 19

aa proteinogénicos. La membrana fue bloqueada, incubada con el mAb 91R o 92R y posteriormente revelada con un anticuerpo secundario acoplado a HRP y ECL. La película resultante fue analizada por densitometría. Se muestra el porcentaje de intensidad de señal frente a cada péptido respecto a la obtenida con el péptido correspondiente a la secuencia original de hCCR9 (n=2). **(B)** Diagrama en el que se agrupa a los veinte aa proteinogénicos en base a sus diferentes propiedades físicas y químicas. (Adaptado a partir de: <http://biomodel.uah.es/model1j/prot/aa-props.htm>).

Mediante esta aproximación experimental, para el mAb 91R, se comprobó que la posición 11 del epítipo mínimo, originalmente ocupada por una Pro, para que pueda mantenerse la capacidad de unión de 91R, solamente puede ser ocupada por la Pro original o Val. Ambos aa son alifáticos apolares, y de tamaño muy parecido (**Fig. 14B**). Para el mAb 92R, Pro11 es sustituible por Phe, Tyr, Trp (todos aa aromáticos no cargados) y por Ala y Val (aa alifáticos, apolares y de tamaño parecido a Pro). Por tanto, esta posición requiere un aa de estructura y polaridad específicas para que se produzca la interacción con los mAb 91R y 92R.

Cuando se reemplaza el residuo Asn12 (aa polar, sin carga, relativamente pequeño) de CCR9 por otros aa se pierde por completo la capacidad de unión tanto de 91R como de 92R. Solo se observa algo de señal, del orden de diez veces menor que para la Asn,

cuando esa posición se sustituye por Ser (de todos los aa polares sin carga, el más pequeño). Estos resultados indican que en esta posición debe estar presente un aa de tamaño y propiedades muy específicas para que se produzca la interacción tanto con 91R como con 92R. El grupo carboxiamida de la Asn12 podría tener un papel clave en la interacción epítipo-mAb.

Para el mAb 91R, el residuo Met13 (aa grande, apolar) es sustituible por Gln, Ile, Leu (aa sin carga, medianos) y en menor medida por Phe, Trp (aa sin carga, aromáticos y relativamente grandes) y Asn, Cys y Ser (aa polares y relativamente pequeños). Para 92R, Met13 es sustituible por Gln, Ile, Leu, Asn, Ala, Cys (aa sin carga, entre medianos y pequeños), por Arg (aa cargado positivamente, grande), y en menor medida por Phe y Trp (aa sin carga, aromáticos y relativamente grandes). Por ello, aunque la señal máxima se observa cuando la posición 13 corresponde a una Met, se trata de una posición que aunque se alteren las características del aa que la ocupa, tanto en tamaño como en carga eléctrica, la unión del péptido a 91R y a 92R puede mantenerse.

En el caso del residuo Ala14 (aa muy pequeño, apolar), para mantener el reconocimiento por 91R sólo es sustituible por Asn, Gln y Ser (aa polares sin carga) y para 92R sólo por Asn y Ser. No obstante, la señal que obtenemos cuando esta posición está ocupada por dichos aminoácidos es notablemente inferior que para Ala. Por tanto, se trata de una posición que requiere de un aa de tamaño y polaridad muy concretos para que se produzca la interacción del péptido tanto con 91R como con 92R.

El residuo Asp15 (aa relativamente pequeño y cargado negativamente) es el aa más fácilmente sustituible de todos los analizados. Para 91R, se mantiene la interacción con 91R aún cuando es sustituido por Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, Phe, Ser, Thr, Trp, entre los que se incluyen aa apolares y polares, con carga positiva y negativa, aromáticos, grandes, pequeños... Del mismo modo, para 92R, Asp15 es sustituible por una gran variedad de aa, Ala, Asn, Cys, Glu, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val. Esto indica que el aa localizado en esta posición no participa de forma activa en la interacción ni con 91R ni con 92R.

Con respecto a la carga negativa de la posición Asp16, esta parece esencial para la interacción entre el epítipo de hCCR9 y los mAb 91R y 92R. Solo cuando esta posición está ocupada por un aa con carga negativa, es decir Asp o Glu, existe interacción entre el péptido y los mAb anti hCCR9.

En resumen, el análisis sistemático de todas las posibles sustituciones de cada una de las posiciones del epítipo mínimo de hCCR9 necesario para la interacción con los mAb 91R y 92R ha permitido identificar a las posiciones Pro11, Asn12, Ala14 y Asp16 como relevantes para que este epítipo pueda ser reconocido por los dos anticuerpos. En particular, la Asn en posición 12 y la carga negativa del aa en la posición 16 resultan imprescindibles para que se produzca la unión antígeno-anticuerpo. No se observaron diferencias relevantes en el comportamiento de ambos mAb, 91R y 92R, frente a los distintos péptidos.

1.8 Secuenciación de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los mAb 91R y 92R

Los mAb 91R y 92R tienen diferentes isotipos, IgG2b e IgG2a, respectivamente. Sin embargo, se asemejan mucho en sus sitios de unión a hCCR9 y en las propiedades de estas uniones. Por este motivo, se decidió analizar las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de ambos mAb. Se utilizó el método descrito por Wang et al., basado en la utilización de oligonucleótidos degenerados para la amplificación, mediante PCR, del material genético correspondiente a las regiones variables de Ig de ratón de secuencia desconocida.

Wang y colaboradores analizaron las secuencias registradas en la base de datos de Kabat de Ig de ratón (Kabat, 1991). Calcularon las frecuencias de cada nucleótido en las distintas posiciones correspondientes a la región marco 1 (*framework* 1, FR1) e identificaron los nucleótidos dominantes en cada posición. En base a este cálculo, diseñaron oligonucleótidos 5' altamente degenerados tanto para la cadena pesada como para la ligera de Ig murinas. Como oligonucleótidos 3' emplearon oligonucleótidos específicos para cada isotipo, correspondientes al primer dominio de la región constante de cada cadena pesada de Ig o un oligonucleótido correspondiente a la región constante de la cadena ligera κ .

Como molde para las PCR con los oligonucleótidos degenerados se empleó cDNA obtenido a partir de diferentes extractos de RNA de los hibridomas 91R y 92R. Al utilizar oligonucleótidos degenerados, la amplificación sólo resulta efectiva utilizando una DNA polimerasa sin actividad correctora de errores. Por ello, se realizaron múltiples retrotranscripciones a cDNA y varias PCR para la obtención de secuencias consenso generadas a partir de un número elevado de secuencias, con el fin de que posibles errores derivados de la amplificación con dicha DNA polimerasa fueran fácilmente identificables.

En el caso de las cadenas pesadas, se secuenciaron los productos de amplificación de las PCR y se obtuvieron secuencias consenso a partir de al menos 16 secuencias independientes. Ninguna de las alteraciones respecto de la secuencia consenso se encontró repetida en más de una de las 16 secuencias obtenidas. En el caso de las cadenas ligeras, los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos degenerados, en la secuenciación dieron lugar a dobles picos. Esto se debe a que en los extractos de RNA de los hibridomas se encuentran mRNA de cadenas ligeras no productores, resultantes de reordenamientos génicos no funcionales, junto con los mRNA de las cadenas ligeras sí productores, resultantes de un posterior reordenamiento génico sí funcional. Por ello, para su secuenciación, los fragmentos de PCR de las cadenas ligeras se clonaron en plásmidos con los que se transformaron bacterias *E. coli*. La posterior selección de colonias aisladas nos permitió obtener secuencias únicas. Se purificaron plásmidos que contenían cada uno de los distintos fragmentos, productores y no productores, se secuenciaron y se seleccionaron los resultantes de un reordenamiento génico sí funcional. Se utilizó un mínimo de 10 secuencias productoras independientes para generar la correspondiente secuencia consenso.

En la **figura 15** se muestra el alineamiento de las secuencias consenso resultantes para las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de 91R y 92R. Como puede observarse, la similitud en las secuencias de las regiones variables de ambos mAb es muy elevada. Las regiones variables de las cadenas pesadas de 91R y 92R presentan un 97,1% de identidad de secuencia de nucleótidos, y las ligeras un 94,6%.

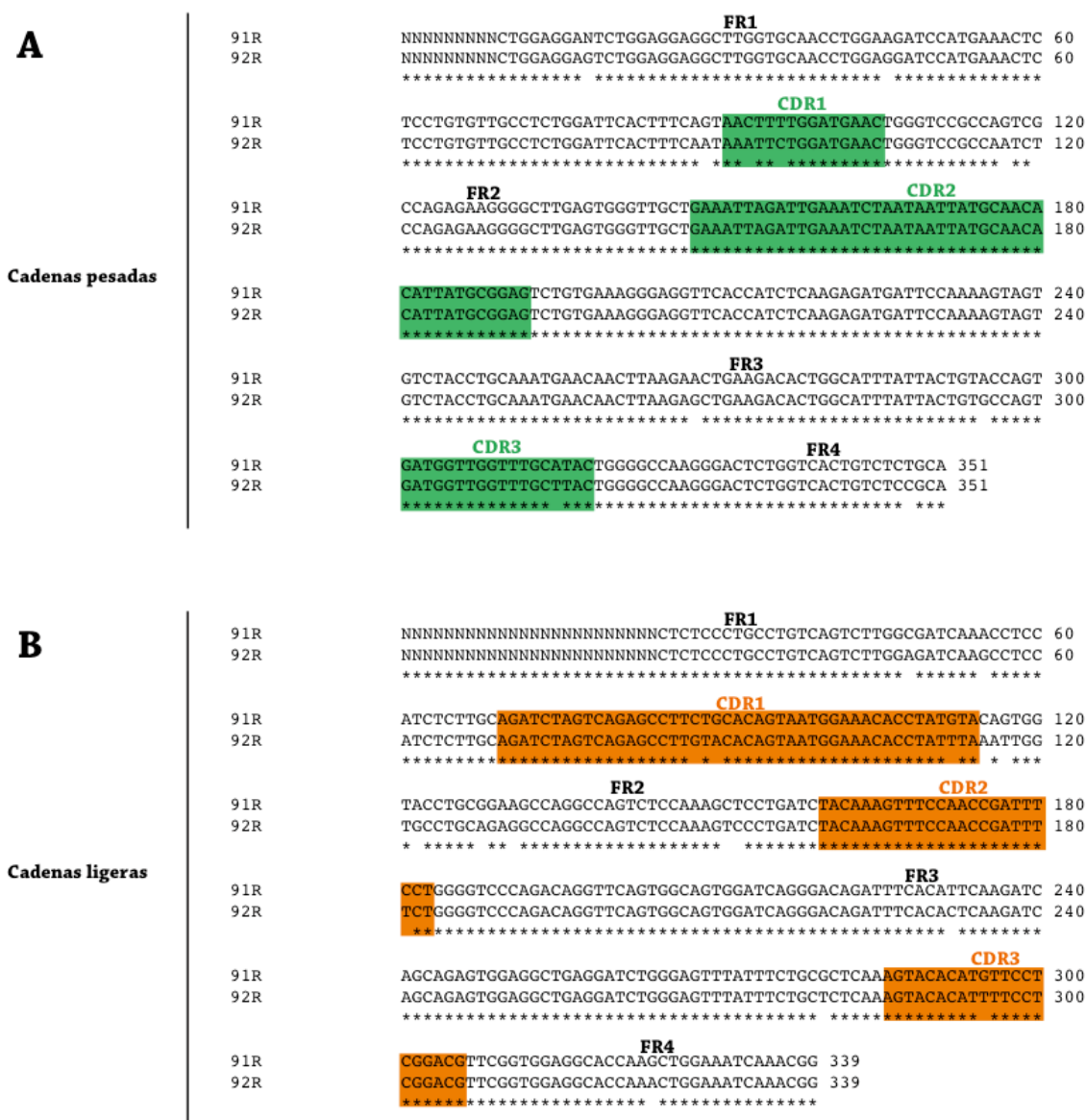


Figura 15. Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de las cadenas de Ig de 91R y 92R presentan alto grado de identidad.

(A) Alineamiento de las regiones variables de las cadenas pesadas de los mAb 91R y 92R. **(B)** Alineamiento de las regiones variables de las cadenas ligeras de los mAb 91R y 92R. Programa Clustal, versión 2.1. Las regiones determinantes de la complementariedad, determinadas según el modelo de Kabat, están resaltadas en color.

FR (región marco, del inglés framework region); CDR (región determinante de la complementariedad, del inglés, complementary determining región).

Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de 91R y 92R fueron traducidas a la secuencia de aa correspondiente. La PCR realizada utiliza oligonucleótidos degenerados en 5', por lo que no proporciona información sobre la secuencia correspondiente al extremo amino de las FR1, donde aparean dichos oligonucleótidos. Para determinar los aa correspondientes al extremo N-terminal de las distintas cadenas, se llevó a cabo su secuenciación mediante degradación de Edman (Niall, 1973). Los mAb 91R y 92R se purificaron por afinidad en una columna de proteína G sefarosa y se resolvieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se recortaron las bandas del gel correspondientes a la cadenas pesada y ligera de cada mAb, que se utilizaron para llevar a cabo una secuenciación de Edman e identificar los primeros 16-17 aa de cada cadena polipeptídica. Los resultados de la secuenciación de Edman combinados con la traducción de la secuencia de nucleótidos se muestran en la **figura 16**.

Para confirmar si la secuencia de aa predicha era correcta, se realizaron análisis MS MALDI-TOF a partir de bandas de geles de poliacrilamida de los mAb 91R y 92R resueltos en condiciones desnaturalizantes. Los fragmentos obtenidos tras la digestión con tripsina y quimotripsina generaron un espectro de masas compatible con las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación de nucleótidos y por los resultados de la secuenciación de aa del extremo N-terminal mediante la técnica de degradación de Edman.



Figura 16. Las secuencias de aa de las regiones variables de las cadenas de Ig de 91R y 92R presentan alto grado de identidad.

(A) Alineamiento de las regiones variables de las cadenas pesadas de los mAb 91R y 92R. **(B)** Alineamiento de las regiones variables de las cadenas ligeras de los mAb 91R y 92R. Programa Clustal, versión 2.1. (*) posición conservada, (:) posición ocupada por aa con propiedades similares, (.) posición ocupada por aa con propiedades poco conservadas. Las regiones determinantes de la complementariedad, determinadas según el modelo de Kabat, se resaltan en color.

FR (región marco, del inglés framework region); CDR (región determinante de la complementariedad, del inglés, complementary determining región).

Como puede observarse en el alineamiento de las secuencias de aa de las regiones variables de 91R y 92R, el porcentaje de similitud de secuencia entre ambos mAb es muy elevado. Las regiones variables de las cadenas pesadas de 91R y 92R presentan un 94,9% de identidad de secuencia de aa, y las ligeras un 89,4%. Los CDR 2 y 3 de las cadenas pesada y el CDR2 de las cadenas ligeras de los mAb 91R y 92R tienen conservados todos sus residuos. La elevada identidad de secuencia en las regiones variables de ambos mAb concuerda con la similitud en sus propiedades de unión a hCCR9, incluyendo la afinidad por el antígeno y el epítipo reconocido.

1.9 Modelo de interacción molecular entre un péptido correspondiente a las posiciones de aa 10-18 de hCCR9-A y las regiones variables del mAb 91R

Una vez identificado el epítipo mínimo de hCCR9 reconocido por 91R y 92R, así como las secuencias de las regiones variables de ambos mAb, fue posible modelizar la estructura tridimensional de los mAb y así estudiar qué aa participan en la interacción antígeno-anticuerpo. Para ello, en ausencia de una estructura cristalográfica del mAb, se emplearon programas bioinformáticos de modelado de estructura de anticuerpos.

La región de unión al antígeno está formada por los dominios variables de cada una de las cadenas de Ig (VL y VH). Dentro de las mismas, los sitios de interacción con el antígeno corresponden a las regiones CDR, que forman seis bucles (*loops*) hipervariables, tres en la cadena ligera (CDR-L1, L2 y L3), y tres en la cadena pesada (CDR-H1, H2, H3). El resto de las regiones variables son las denominadas marco (*framework*), que se encuentran muy conservadas a nivel estructural y cuyos aa varían muy poco entre distintos anticuerpos del mismo isotipo. Por tanto, el principal reto en la modelización estructural de mAb se centra en la predicción de la conformación de las zonas CDR.

La mayoría de CDR (a excepción de CDR-H3) adoptan un número limitado de conformaciones, conocidas como estructuras canónicas (Chothia et al., 1989). Las estructuras canónicas pueden asignarse a una secuencia dada, por comparación con otras secuencias homólogas para las que la estructura cristalográfica haya sido ya resuelta. El número de estructuras cristalográficas de anticuerpos disponibles en las bases de datos no deja de crecer, por lo que la asignación de las conformaciones de las CDR L1, L2, L3, H1 y H2 puede realizarse hoy en día con un alto grado de exactitud [RMSD (desviación de la media cuadrática, del inglés *root mean square deviation*) entre el modelo y la estructura nativa suele ser $< 1,0 \text{ \AA}$] (Kuroda et al., 2012).

El *loop* CDR-H3 se localiza en el centro del sitio de interacción con el antígeno. Adopta diversas conformaciones y suele experimentar cambios conformacionales tras la interacción con el antígeno, dificultando el establecimiento de reglas que relacionen secuencia con estructura. Además, el *loop* CDR-H3 se localiza cerca de la superficie de contacto con la región VL, por lo que la predicción de la orientación relativa de los dominios variables VL y VH afecta a la modelización del CDR-H3 y viceversa.

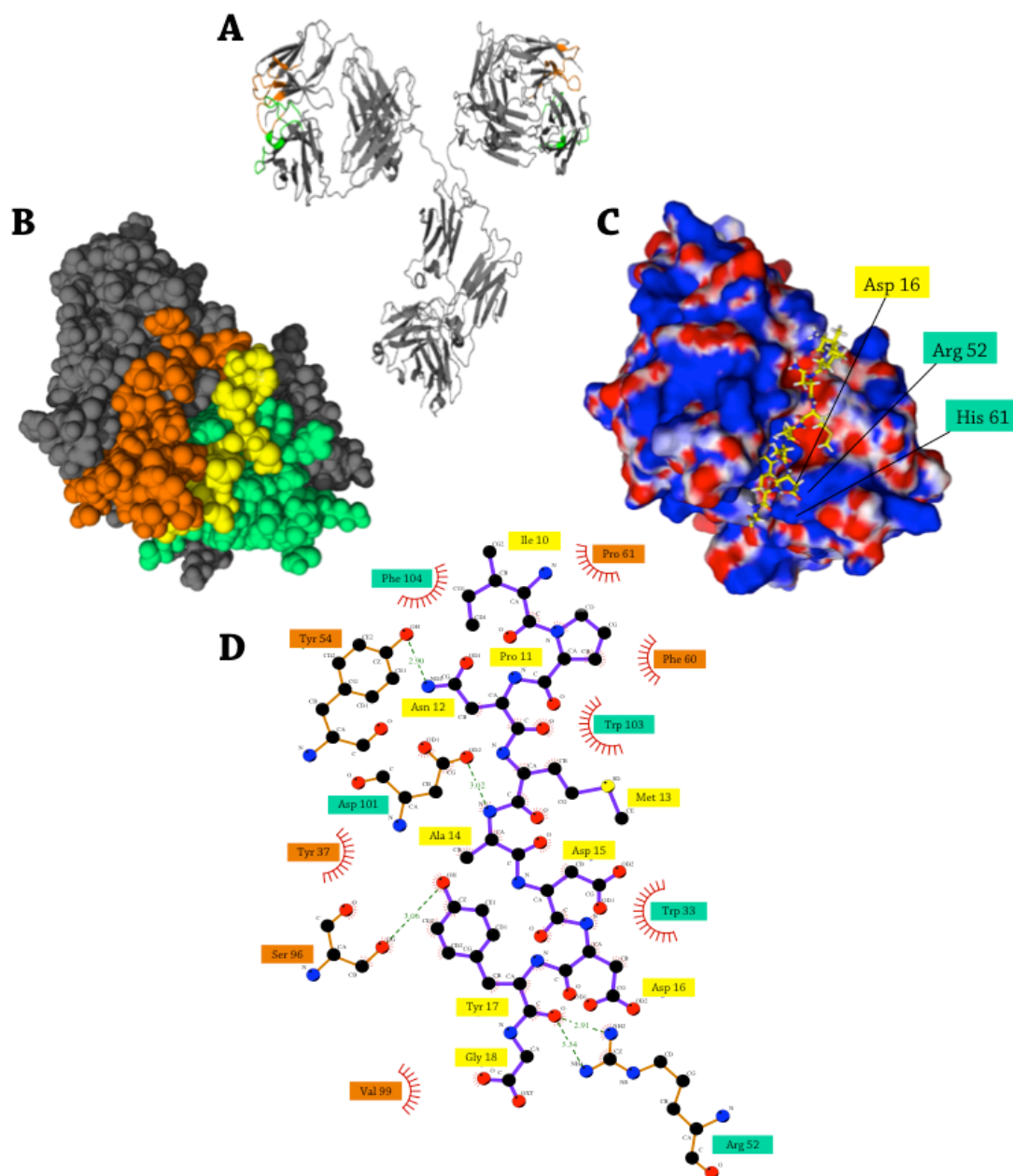


Figura 17. El péptido modelizado correspondiente a las posiciones de aa 10-18 de hCCR9-A interaccionaría mediante fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos con las regiones variables del mAb 91R.

(A y B) Modelo de la estructura del mAb 91R **(A)** y de la interacción entre el péptido hCCR9(10-18) (amarillo) y las regiones variables pesada (verde) y ligera (naranja) del anticuerpo 91R **(B)**. La estructura de 91R se predijo con el programa RosettaAntibody y el acoplamiento peptídico se estableció con los programas Pepsite2 para determinar el lugar de unión y la orientación del péptido y Rosetta FlexPepDock para el refinamiento de las posiciones del esqueleto peptídico y las cadenas laterales de hCCR9(10-18). Las figuras se generaron con el programa de visualización molecular Pymol. **(C)** Representación de la carga electrostática en la superficie del mAb 91R realizada con el complemento APBD del programa Pymol. Las cargas netas negativas se representan en azul y las positivas en rojo. **(D)** Diagrama de los puentes de hidrógeno y los contactos hidrofóbicos entre el mAb 91R y el péptido hCCR9(10-18) obtenido con el programa Ligplot⁺. Los puentes de hidrógeno predichos se indican con líneas de puntos entre los átomos implicados, la distancia que los separa se indica en Å. Los contactos hidrofóbicos se representan mediante arcos con radios apuntando hacia el átomo con el que interaccionan.

Para el modelado bioinformático de la estructura del mAb 91R se emplearon en paralelo dos programas, RosettaAntibody (Sircar et al., 2009) y PIGS (Marcatili et al., 2008). Como complemento también se emplearon métodos bioinformáticos para estudiar la interacción anticuerpo-antígeno. En general, los epítomos antigénicos de proteínas son discontinuos en la secuencia (Barlow et al., 1986; Van Regenmortel, 1996), lo que dificulta el modelado de la interacción anticuerpo-antígeno. En este caso, al haberse demostrado que los péptidos que contienen el epítomo lineal mínimo de seis aa hCCR9-A(11-16) mantienen la capacidad de unión a los anticuerpos 91R y 92R, se optó por utilizar un programa de modelado de interacción péptido-proteína, Rosetta FlexPepDock (London et al., 2011). Con este programa se modelaron las interacciones entre el péptido hCCR9(10-18) y cada uno de los modelos obtenidos para la estructura de 91R. Este tipo de modelado refina y encuentra la conformación del péptido más favorable energéticamente, a partir de una posición de partida. Por tanto es necesario identificar el sitio de unión y dirección del péptido más probable. Para ello se utilizó PepSite2 (Trabuco et al., 2012). Con este programa se identificó el lugar de unión más probable entre los modelos obtenidos para 91R y un péptido correspondiente a los aa 11-16 de la secuencia de hCCR9-A, además se resolvieron las más probables direcciones y orientaciones de dicho péptido en su interacción con 91R. Esta información se utilizó como datos de partida para el programa Rosetta FlexPepDock.

Pepsite2 y Rosetta FlexPepDock ofrecen valores que, teniendo en cuenta diferentes variables energéticas, puntúan las distintas soluciones de interacción péptido-proteína. En general, se obtuvieron siempre mejores valores para el acoplamiento de los diferentes péptidos cuando la estructura del mAb de partida correspondía a la obtenida con el modelo RosettaAntibody. La representación de la estructura de VL y VH de 91R predicha por RosettaAntibody y su interacción con el péptido hCCR9(10-18) modelizada por Pepsite2 y Rosetta FlexPepDock se muestra en la **figura 17B**.

Asimismo, se calculó el potencial electrostático en la superficie de 91R a partir del modelo de RosettaAntibody (**Fig. 17C**). En la figura se indica la posición del aa Asp16 del péptido hCCR9(10-18), cuya carga negativa se había identificado como esencial para la interacción antígeno-anticuerpo, mediante Pepscan. Como puede observarse, dos aa con carga positiva (Arg52 e His61), pertenecientes al CDR2 de la VH de 91R, se localizan muy próximos al Asp16 del péptido hCCR9(10-18) de acuerdo al modelado estructural de RosettaAntibody.

Finalmente, se utilizó el programa LigPlot+ (Laskowski and Swindells, 2011) para analizar las interacciones entre el modelo de estructura de 91R y el péptido hCCR9(10-18). Se generó un diagrama de los puentes de hidrógeno y los contactos hidrofóbicos establecidos entre 91R y el péptido (**Fig. 17D**). Como se observa en esta figura, el residuo Asn12 del epítomo de hCCR9, que también había sido identificado como imprescindible para la interacción con 91R mediante Pepscan, podría formar un puente de hidrógeno con la Tyr54 del CDR2 de la VL de 91R.

2. Evaluación de la actividad antitumoral de los anticuerpos 91R y 92R utilizando células de leucemia humana CCR9⁺

2.1 Citotoxicidad celular dependiente de células NK mediada por los mAb 91R y 92R en células MOLT-4

Con el fin de determinar el potencial de CCR9 como diana en inmunoterapia antitumoral se analizó, en ensayos *in vitro*, si los mAb anti hCCR9 pueden mediar acciones efectoras sobre células hCCR9⁺ de leucemia humana MOLT-4. Las células NK presentan receptores de Fc en su membrana plasmática, y son capaces de lisar células diana marcadas en su superficie por algunos anticuerpos (Clynes et al., 2000).

Se realizaron ensayos *in vitro* de lisis específica de células MOLT-4 preincubadas con los mAb 91R o 92R y expuestas a la acción efectora de células NK murinas. Las células NK se aislaron del bazo de ratones BALB/c y se activaron mediante su cultivo, durante 6 o 7 días en presencia de IL-2. Las células purificadas y activadas se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su nivel de expresión de los marcadores celulares de ratón CD3, CD45 y CD49b. Todas las preparaciones celulares que se utilizaron contenían al menos un 90% de células NK, definidas como aquellas con fenotipo CD3⁻/CD45⁺/CD49b⁺.

La actividad citotóxica de las células NK se calculó como el porcentaje de células diana MOLT-4 lisadas tras su preincubación con diferentes anticuerpos anti hCCR9 o con un mAb control, seguida de la incubación con las células NK murinas. El porcentaje de células muertas respecto al total de la muestra se estimó en un citómetro de flujo, por incorporación del reactivo 7-AAD. Para discernir las células diana MOLT-4 de las células NK, las primeras fueron teñidas antes del ensayo con el colorante verde fluorescente CFSE. De este modo, el análisis del porcentaje de células 7-AAD⁺ dentro de las células marcadas en verde con CFSE permitió determinar el porcentaje de células diana muertas.

Como puede observarse en la **figura 18A**, ambos mAb anti hCCR9, 91R y 92R, promovieron niveles de lisis específica superiores al 50% (91R: 57,7 ± 1,1%; 92R: 54,9 ± 4,1%), mayores que el nivel obtenido con el mAb anti hCCR9 comercial 112509 (IgG2a) (20,5 ± 0,8%). Como control positivo, se empleó una mezcla (*pool*) de sueros de ratones inmunizados con células MOLT-4, que indujo la lisis celular máxima en estas condiciones del ensayo (91,1 ± 1,1%).

Con el objetivo de analizar cómo afecta la concentración de los mAb 91R y 92R a su capacidad de inducir citotoxicidad celular específica por células NK se realizó una curva de concentraciones crecientes de ambos mAb. Se observó que la concentración mínima necesaria durante la opsonización para producir una respuesta detectable fue de 0,004 µg/ml; y que a una concentración de 0,4 µg/ml los mAb 91R y 92R alcanzaban una lisis específica de 42,4% y de 39,1%, respectivamente (**Fig. 18B**). Para ambos mAb, la lisis celular específica pudo incrementarse hasta el 69%, aumentando el ratio de células NK por célula diana (**Fig. 18C**). Estos resultados demuestran la capacidad de los mAb anti hCCR9 91R y 92R de mediar citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpo, y sustentan su potencial como herramientas antitumorales.

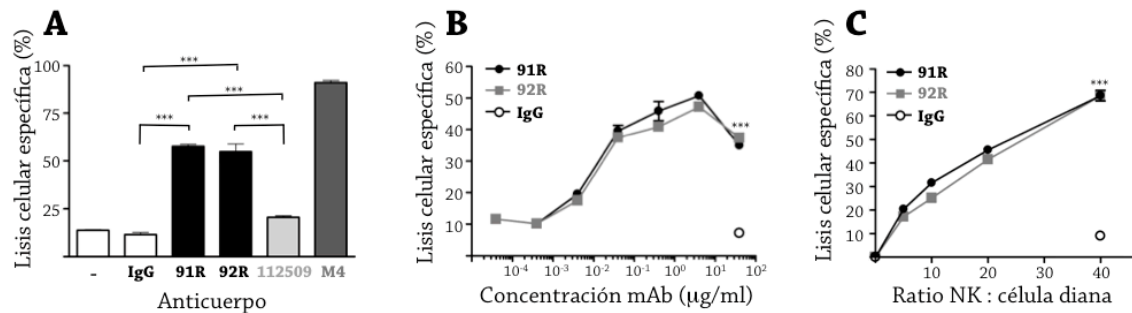


Figura 18. Los mAb 91R y 92R median citotoxicidad dependiente de células NK en células de leucemia humana MOLT-4.

(A-C) Las células diana MOLT-4 se marcaron con el colorante verde fluorescente CFSE y se incubaron con el mAb indicado (30 min, 37°C). Las células NK se aislaron a partir de bazos de ratones BALB/c y se mantuvieron en cultivo durante 6-7 días en medio de cultivo suplementado con IL-2. Las células NK y las células MOLT-4 fueron posteriormente cocultivadas en un ratio 20:1 –o en el ratio indicado– (4 h, 37 °C). La lisis celular específica se determinó marcando las células muertas con 7-AAD y analizando por citometría el porcentaje de células verdes y 7-AAD⁺. **(A)** Lisis celular específica mediada por células NK en ausencia de mAb, o en presencia de IgG control, de los mAb 91R, 92R, 112509 (20 µg/ml) o de una mezcla de sueros de ratones inmunizados con células MOLT-4 (M4; 1:1000). Se muestra la media ± SEM de triplicados de un experimento representativo de seis realizados. **(B)** Curva de dosis-respuesta de la lisis específica mediada por células NK en presencia de concentraciones crecientes de 91R y 92R. Se muestra la media ± SEM de un experimento representativo (n = 4). **(C)** Lisis específica mediada por 91R, 92R, en función del ratio de células NK: MOLT-4. Se muestra la media ± SEM de un experimento representativo de cuatro realizados. Test t-Student *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05.

2.2 Citotoxicidad dependiente de complemento mediada por los mAb 91R y 92R en células MOLT-4

La CDC ha sido descrita como uno de los principales mecanismos de los anticuerpos terapéuticos para la eliminación de células tumorales (Scott et al., 2012; Weiner et al., 2010). Por ello, se analizó *in vitro*, la capacidad de los mAb 91R y 92R de mediar la lisis de células MOLT-4 de leucemia humana mediante la activación del sistema del complemento.

Las células MOLT-4 se pre incubaron con los mAb anti hCCR9 91R, 92R, 112509, con anticuerpos control, o con un *pool* de sueros murinos anti células MOLT-4 (M4). A continuación, las células se incubaron durante una hora con complemento de conejo activo o inactivado por calor. La lisis celular específica se determinó en un citómetro de flujo, por incorporación de 7-AAD.

En la **figura 19A** se muestra la lisis específica mediada por complemento promovida por los mAb 91R (49 ± 2%) y 92R (46 ± 1%). Para ambos mAb los resultados son similares, y notablemente superiores a los del mAb anti hCCR9 comercial 112509 (7,1 ± 0,9%). La mezcla de sueros anti MOLT-4 generó la máxima lisis celular mediada por el complemento de conejo (60 ± 0,8%) en las condiciones experimentales utilizadas.

El nivel de lisis de las células MOLT-4 mediada por 91R y por 92R depende de la concentración de mAb, como se muestra en la curva de dosis-respuesta que muestra un comportamiento sigmoidal (**Fig. 19B**). Se detectó lisis específica desde una concentración de 0,4 $\mu\text{g/ml}$, mientras que a 4 $\mu\text{g/ml}$ el nivel de lisis específica era cercano al 40%, tanto para 91R como para 92R. La CDC promovida por 91R aumentó hasta los niveles máximos del ensayo a medida que se incrementó el porcentaje de complemento (**Fig. 19C**). En conjunto, estos resultados muestran el potencial de 91R y 92R para promover la lisis de células tumorales CCR9⁺.

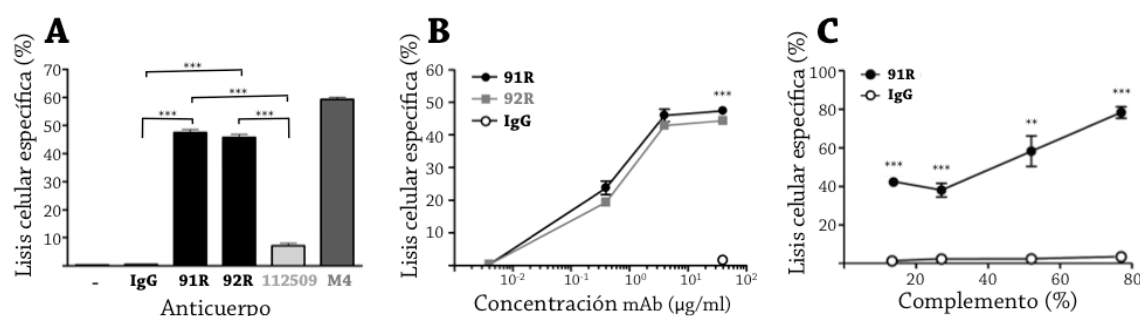


Figura 19. Los mAb 91R y 92R promueven citotoxicidad dependiente de complemento en células de leucemia humana MOLT-4.

(A-C) Las células MOLT-4 se pre incubaron con el mAb indicado (30 min, 37°C), se lavaron e incubaron (1 h) con complemento de conejo al 25%, activo o inactivado por calor a 56°C; la viabilidad celular fue evaluada por tinción con 7-AAD en un citómetro de flujo. **(A)** Lisis específica por complemento en ausencia de mAb o en presencia de 91R, 112509, o de los correspondientes controles isotípicos (40 $\mu\text{g/ml}$). Cada condición fue analizada por triplicado. Se representa la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. **(B)** Curva de dosis-respuesta de la lisis específica por complemento empleando el mAb 91R y un mAb control IgG2b a las concentraciones indicadas. Se representa la media \pm SEM de un experimento representativo de cuatro realizados. **(C)** Lisis específica por complemento en función de la concentración de complemento. Se muestra la media \pm SEM de triplicados de un experimento representativo de dos realizados. Test t-Student *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

2.3 Análisis del crecimiento de tumores xenogénicos en ratones iniciando el tratamiento con el mAb 91R o 92R al día siguiente de la inoculación de las células tumorales

Dados los resultados obtenidos *ex vivo*, el siguiente objetivo fue evaluar la capacidad de los mAb 91R y 92R de inhibir el crecimiento de tumores hCCR9⁺ *in vivo* (Jung, 2014). Para ello, se emplearon células de leucemia humanas implantadas como tumores xenogénicos en ratones inmunodeficientes BALB/c Rag2^{-/-}. Las células MOLT-4 se inocularon por vía subcutánea a cuatro grupos de nueve ratones cada uno. Cada grupo recibió una inyección intraperitoneal semanal del mAb 91R, 92R o de un mAb control isotípico (IgG2b o IgG2a). Los ratones recibieron dos inyecciones de 100 μg de mAb, seguidas de otras dos inyecciones de 50 μg , iniciándose el tratamiento al día siguiente de la inoculación de las células tumorales (**Fig. 20A**).

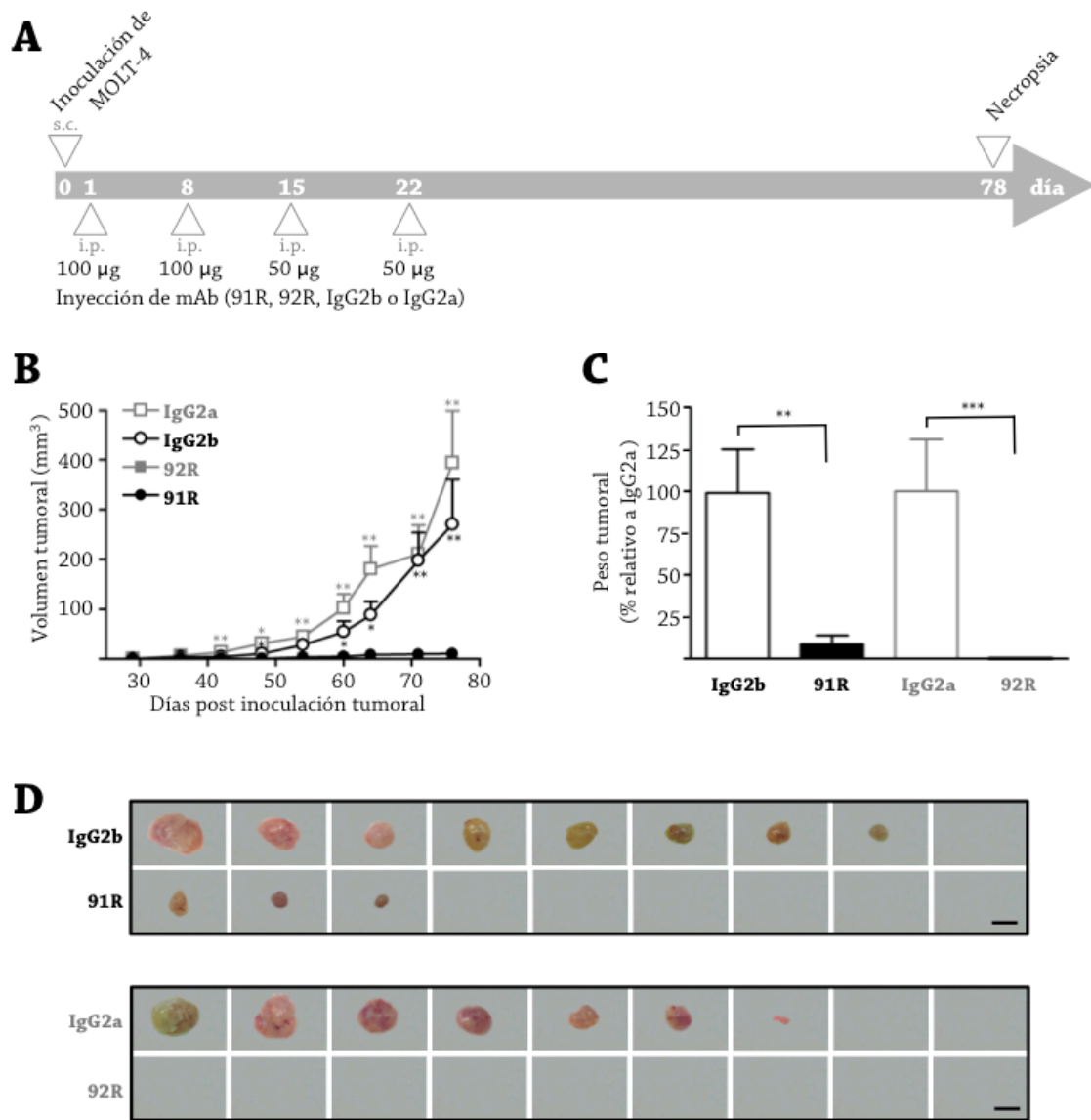


Figura 20. Los mAb 91R y 92R inhiben el crecimiento de tumores xenogénicos de células de leucemia humana MOLT-4.

En ensayos xenogénicos, las células MOLT-4 se inyectaron por vía subcutánea en ratones BALB/c Rag2^{-/-} el día 0. Cada grupo experimental recibió cuatro dosis intraperitoneales del mAb 91R, 92R o sus correspondientes mAb control isotípico, las dos primeras (días 1 y 8) de 100 µg/ratón (4 mg/kg), y las dos siguientes (días 15 y 22) de 50 µg/ratón (2 mg/kg). Cada 4-7 días se midió el crecimiento tumoral con un vernier caliper. Al final del experimento (día 78) los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos, pesados y fotografiados (n = 9 ratones/grupo). **(A)** Esquema del tratamiento con anticuerpos tras la inoculación de 2×10^6 células tumorales en uno de los flancos de cada ratón. **(B)** Cinética del crecimiento tumoral. El volumen de los tumores se midió en los días indicados y fue calculado según la fórmula $V = [\text{diámetro axial, mm}] \times [(\text{diámetro rotacional, mm})^2 / 2]$. **(C)** Porcentaje del peso de los tumores en relación al grupo control en el día 78. Media \pm SEM. **(D)** Imágenes de los tumores de ratones tratados con 91R, 92R o los correspondientes mAb control isotípico (día 78) Barra = 1 cm. Test t-Student *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

El tamaño de los tumores en desarrollo se midió mediante un vernier caliper hasta el día 78, cuando los ratones fueron sacrificados. Los tumores subcutáneos de los ratones tratados con los mAb anti hCCR9 apenas fueron detectables, mientras que los tumores de los ratones tratados con los mAb control mostraron un crecimiento exponencial y alcanzaron tamaños elevados (**Fig. 20B**).

Los tumores fueron extraídos el día 78 y se pesaron y fotografiaron. La media del peso de los tumores en el grupo tratado con IgG2a fue de $1,25 \pm 0,39$ g y en el grupo IgG2b fue de $1,23 \pm 0,33$ g. Por el contrario, en el grupo de ratones tratados con 91R la media del peso de los tumores fue $0,11 \pm 0,06$ g y ninguno de los ratones del grupo tratado con 92R desarrolló tumores detectables (**Fig. 20C**).

La mayoría de los ratones tratados con los mAb control habían desarrollado tumores observables el día de la necropsia; sólo uno de los ratones tratados con IgG2b y dos ratones tratados con IgG2a no presentaba tumores. Sin embargo, seis ratones tratados con 91R y los nueve ratones tratados con 92R estaban libres de tumor (**Fig. 20D**).

Los datos obtenidos en este modelo xenogénico confirman la capacidad de los mAb anti hCCR9 de inhibir *in vivo*, el crecimiento de tumores de células humanas CCR9⁺.

2.4 Análisis del crecimiento de tumores xenogénicos en ratones iniciando el tratamiento con el mAb 91R una semana después de la inoculación tumoral

Para determinar la capacidad del mAb 91R de inhibir el crecimiento tumoral en condiciones más exigentes, se realizó un nuevo tratamiento, utilizando también cuatro dosis de mAb, pero iniciando las inyecciones de anticuerpo 7 días después de la inoculación de las células tumorales. En este experimento, se utilizaron dos grupos de diez ratones a los que se administraron las células MOLT-4 de forma subcutánea y se trataron con un mAb control IgG2b o con el mAb 91R. Las dosis de mAb fueron 100 µg de mAb los días 7 y 14 y de 50 µg los días 21 y 28 del tratamiento (**Fig. 21A**).

La gráfica de seguimiento del tamaño tumoral mediante vernier caliper muestra, una vez más, un crecimiento exponencial de los tumores en el grupo de ratones tratados con el mAb control; mientras que el crecimiento de los tumores en el grupo de los tratados con 91R se muestra claramente inhibido (**Fig. 21B**).

El día 69, los ratones se sacrificaron y los tumores fueron extraídos, pesados y fotografiados. La media del peso de los tumores en el grupo IgG2b fue de $0,45 \pm 0,12$ g. En el grupo de ratones tratados con 91R la media del peso de los tumores fue significativamente inferior ($0,16 \pm 0,06$ g) (**Fig. 21C**).

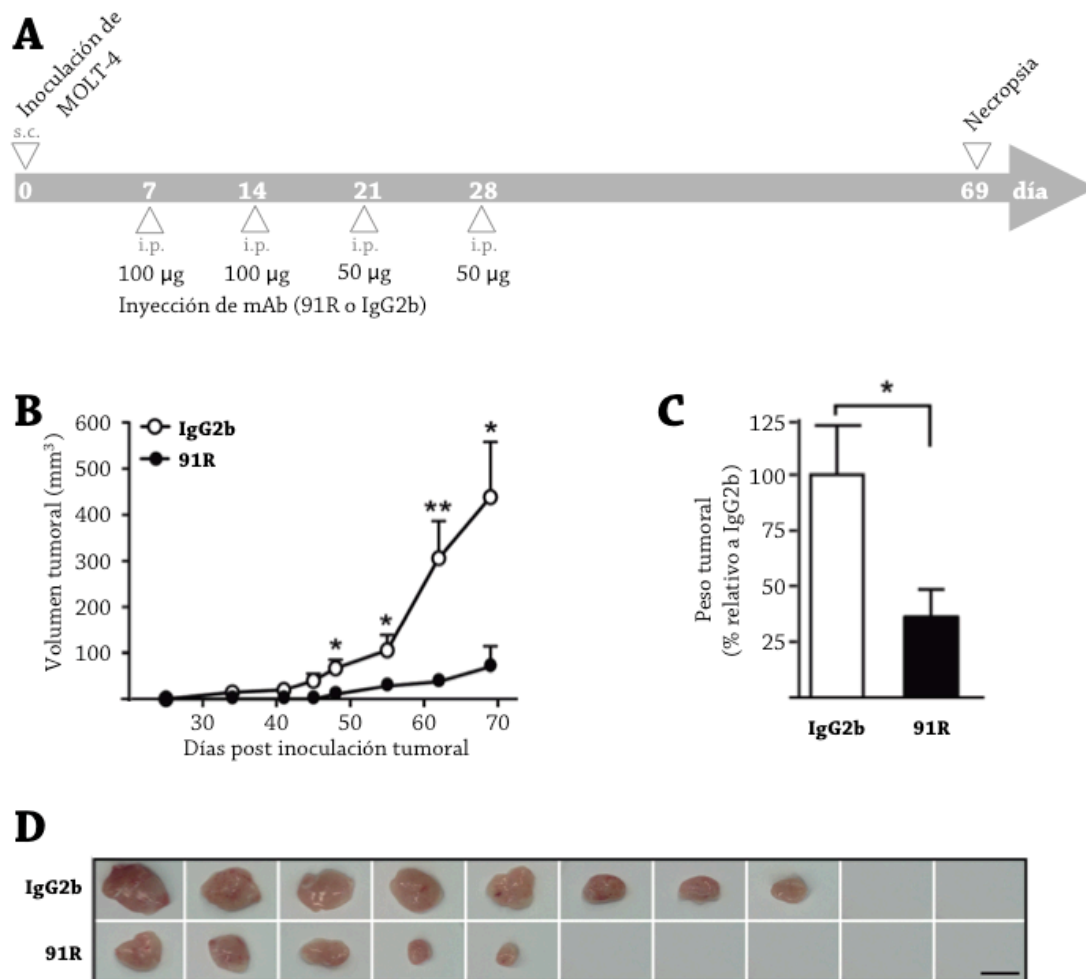


Figura 21. El mAb 91R reduce el crecimiento de tumores xenogénicos en ratones iniciando el tratamiento 7 días después de la inoculación tumoral.

Las células MOLT-4, hCCR9⁺, se inyectaron subcutáneamente en ratones BALB/c Rag2^{-/-} el día 0. Los grupos experimentales recibieron cuatro dosis del mAb 91R o del mAb control isotópico, por vía intraperitoneal; las dos primeras (días 7 y 14) de 100 µg/ratón, y las dos siguientes (días 21 y 28) de 50 µg/ratón. Cada 4-7 días se midió el crecimiento tumoral con un vernier caliper. Al final del experimento (día 69) los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos, pesados y fotografiados (n = 10 ratones/grupo) **(A)** Esquema del tratamiento con anticuerpos tras la inoculación de 2x10⁶ células tumorales en un flanco de cada ratón. **(B)** Cinética del crecimiento tumoral. El volumen de los tumores se midió en los días indicados y fue calculado según la fórmula $V = [\text{diámetro axial, mm}] \times [(\text{diámetro rotacional, mm})^2 / 2]$. **(C)** Porcentaje del peso de los tumores en relación al grupo control en el día 69. Media ± SEM. **(D)** Imágenes de los tumores de ratones tratados con 91R o el mAb control isotópico IgG2b (día 69). Barra = 1 cm. Test t-Student *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05.

Como se observa en la **figura 21D**, dos ratones pertenecientes al grupo tratado con el mAb control y cuatro ratones tratados con 91R no desarrollaron tumores observables al final del experimento. Asimismo, el tamaño de los tumores en el grupo de ratones tratados con 91R era visiblemente inferior.

Estos resultados indican que el mAb 91 mantiene la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, aún actuando sobre inóculos de células tumorales que han tenido siete días para implantarse y crecer en el ratón antes de iniciarse el tratamiento.

2.5 Cinética de inhibición del crecimiento temprano de tumores xenogénicos en ratones tratados con el mAb 91R

Para monitorizar la acción del mAb 91R durante las primeras fases del desarrollo del tumor, cuando la medición con el vernier caliper aún no es posible, se inocularon células MOLT-4 que expresaban la enzima luciferasa (MOLT-4 luc) en el flanco de los ratones. También se estudió el efecto de reducir el número de dosis y la cantidad de mAb en la misma pauta de tratamiento. En esta ocasión, los ratones inmunodeficientes, distribuidos en dos grupos de siete ratones, recibieron dos inyecciones del mAb 91R o del correspondiente mAb control isotópico, en los días 1 (100 μ g/ratón) y 6 (50 μ g/ratón) del tratamiento (**Fig. 22A**).

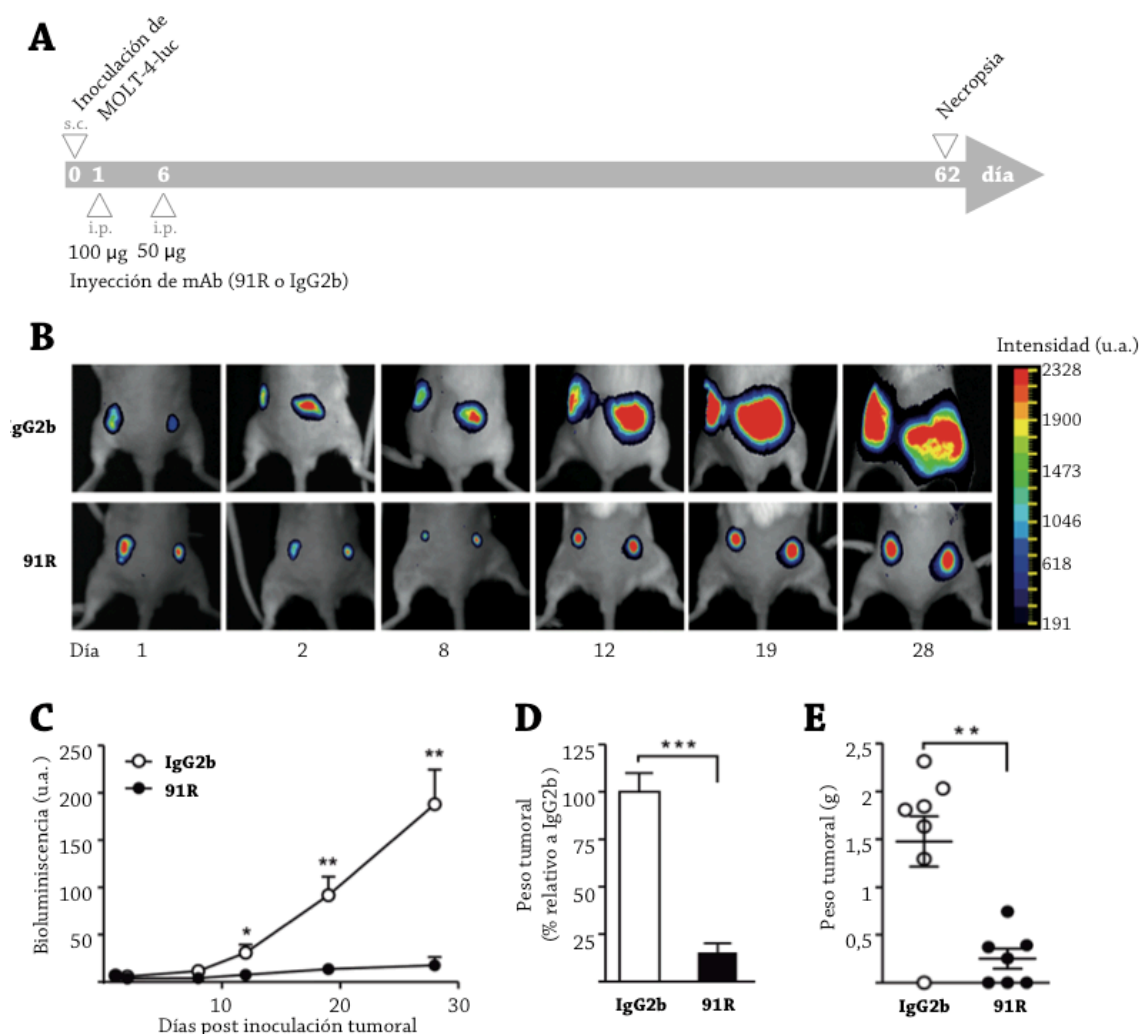


Figura 22. El mAb 91R inhibe eficazmente del desarrollo de tumores xenogénicos cuando se administra a bajas dosis y desde los primeros días del tratamiento.

(A) Pauta de tratamiento en ratones BABL/c Rag2^{-/-} inoculados subcutáneamente en ambos flancos con células MOLT-4 luminiscentes (MOLT-4 luc) el día 0. Los grupos experimentales recibieron inyecciones intraperitoneales de 91R o de un mAb control IgG2b, los días 1 (100 μ g/ratón) y 6 (50 μ g/ratón). Se analizaron las imágenes de luminiscencia desde el día 1 al 28, los ratones se sacrificaron el día 62 y los tumores fueron extraídos. (B) Imágenes de un ratón representativo de cada grupo en los días indicados post inoculación celular. (C) Cinética de crecimiento del tumor tras la inoculación tumoral. Se representan las unidades relativas de bioluminiscencia \pm SEM. (D) Porcentaje de carga tumoral en el día 62 en los ratones tratados con 91R respecto al grupo control. Se muestra la media \pm SEM. (E) Peso de los tumores, media \pm SEM. C-E, (n = 7 ratones/grupo). Test t-Student *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05.

Los tumores implantados se monitorizaron mediante mediciones de la luminiscencia emitida por las células MOLT-4 luc. La inyección de luciferina en el torrente sanguíneo de cada ratón y su posterior observación en una cámara de detección de luminiscencia, permitió evaluar el tamaño de estos tumores desde el día 2 post inoculación de las células tumorales (**Fig. 22B y C**). A lo largo de todo el ensayo, el crecimiento de los tumores en el grupo de ratones tratados con el mAb 91R fue menor que el observado en el grupo de ratones control.

A día 62, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los tumores. En estas condiciones, pese a la reducción de las dosis de mAb suministradas en relación a los experimentos anteriores, 91R originó una disminución de la carga tumoral total de un $85 \pm 11\%$ respecto al grupo control (**Fig. 22D**). Los pesos medios de los tumores fueron de $1,48 \pm 0,26$ g en el grupo tratado con el mAb IgG2b y de $0,22 \pm 0,10$ g en el grupo tratado con 91R (**Fig. 22E**).

Los datos de este experimento *in vivo*, junto con los resultados de los ensayos previamente mencionados, muestran nuevamente una potente actividad antitumoral de 91R y 92R frente a tumores xenogénicos hCCR9⁺.

2.6 Análisis histológico de los tumores xenogénicos de células MOLT-4 procedentes de ratones tratados con 91R

Se realizó un análisis histológico de los tumores xenogénicos de células MOLT-4 derivados de los experimentos anteriores, para evaluar el efecto del tratamiento con 91R. Se tiñeron con hematoxilina-eosina secciones de tumores de ratones tratados con 91R o con el mAb control que se recogieron en la necropsia de los diferentes ensayos. Se calculó el área necrótica en relación con el área total de cada sección tumoral, definiendo región necrótica como aquella carente de células y rodeada de una densa acumulación de núcleos teñidos de morado (**Fig. 23A**). Los tumores se clasificaron en tres categorías en base a la extensión del área necrótica en cada caso: baja (<1%), media (1-30%) y alta (> 30%). Solamente en el grupo de ratones tratados con 91R se detectaron niveles altos de necrosis (en el 40% de los tumores); se observaron niveles medios en el 50% de los tumores de ratones tratados con 91R y en el 20% de los tratados con el mAb control. Las diferencias en la distribución de áreas necróticas para cada tratamiento resultaron significativas ($p < 0,0001$; **Fig. 23B**).

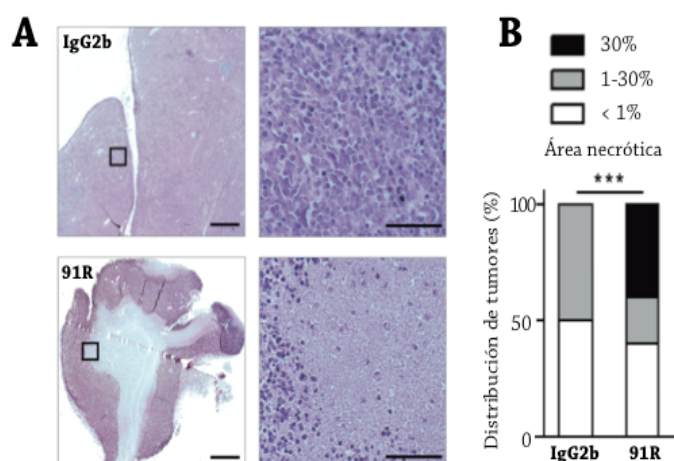


Figura 23. El tratamiento con 91R promueve necrosis en los tumores xenogénicos de células MOLT-4.

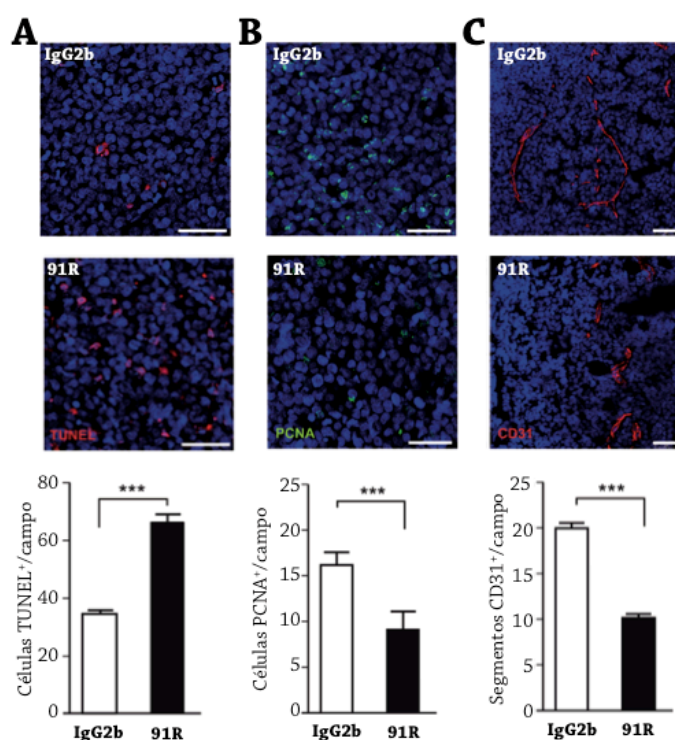
(A) Secciones teñidas con hematoxilina-eosina de tumores xenogénicos de células MOLT-4 desarrollados en ratones tratados con el mAb 91R o con un mAb control. Barra = 2 mm. A la derecha se muestra una región a mayor aumento. Barra = 25 μ m
(B) Porcentaje de tumores clasificados en función de su porcentaje de área necrótica (< 1%, 1-30% y > 30%) en cada grupo de ratones tratados. $n = 7$ ratones/grupo. Test Chi-cuadrado *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Se utilizaron ensayos TUNEL para determinar el grado de apoptosis en los distintos grupos de tumores. La apoptosis podría ser la causa de las zonas acelulares observadas y correspondería a un estadio previo a la desaparición de las células. Los tumores de ratones tratados con 91R mostraron un aumento significativo en la densidad de células apoptóticas en comparación con el grupo control (incremento de 1,93 veces; $p < 0,0001$; **Fig. 24A**).

Asimismo, se analizó el grado de proliferación de las células tumorales. Para ello, las secciones de los tumores fueron teñidas empleando un mAb anti PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación). La tinción mostró una disminución significativa en el número de células proliferantes en los tumores de ratones tratados con 91R en comparación con los tratados con el mAb control (incremento del 40%; $p < 0,0001$; **Fig. 24B**).

El crecimiento tumoral también se asocia con el grado de neovascularización intratumoral (Carmeliet and Jain, 2000; Meert et al., 2002). Por ello, se evaluó la angiogénesis intratumoral en los ratones tratados con 91R o con el mAb control mediante la detección inmunohistoquímica del marcador endotelial CD31. Se observó una reducción en la densidad de microvasos en los tumores de ratones tratados con 91R en comparación con los tratados con el mAb control (reducción del 50,7%; $p < 0,0001$; **Fig. 24C**).

Estos datos indican que 91R interfiere con el crecimiento del tumor mediante el aumento de la muerte celular por apoptosis y de los niveles de necrosis, así como mediante la reducción de la proliferación celular y de la densidad de microvasos en el tumor.



3. Análisis de la expresión de CCR9 en muestras de tumores humanos de diferentes orígenes

3.1 Estudio de la expresión de CCR9 en tumores humanos ginecológicos, de colon y melanomas

Con el propósito de identificar aplicaciones clínicas potenciales de los mAb anti CCR9 generados, y en base a los antecedentes bibliográficos, se llevó a cabo un análisis de la expresión de CCR9 en tejidos neoplásicos humanos de origen ginecológico, melanomas, carcinomas y neoplasias hematológicas.

Tres publicaciones de un grupo de investigación describen la expresión de CCR9 en células malignas de origen ginecológico. En dos de ellas se emplean líneas celulares de mama y de ovario hCCR9⁺ para estudiar la resistencia a apoptosis mediada por la activación del eje CCL25/CCR9 (Johnson et al., 2010; Johnson-Holiday et al., 2011b). En la tercera se analizan 9 muestras de parafina de tejido no neoplásico, 18 de tumores de mama moderadamente diferenciados y 18 de tumores de mama pobremente diferenciados, observando que la tinción anti CCR9 es progresivamente mayor a medida que disminuye el nivel de diferenciación celular (Johnson-Holiday et al., 2011a). En base a estos datos, se realizó un estudio, en colaboración con facultativos del Hospital Universitario de Torrejón, de la expresión de CCR9 en muestras de diferentes tumores de origen ginecológico mediante RT-qPCR. Las muestras, procedentes de extirpaciones quirúrgicas realizadas con fines diagnósticos y/o terapéuticos, se mantuvieron almacenadas embebidas en parafina en el servicio de anatomía patológica del Hospital Universitario de Torrejón. Los datos clínicos de las pacientes incluidas en el estudio se muestran en la **tabla 11**. En total se han analizado 8 tumores de mama, 4 tumores de endometrio, 5 de ovario, uno de trompa, 3 de cérvix y uno de útero.

Tabla 11. Información diagnóstica de las pacientes con tumores ginecológicos incluidas en el estudio

Caso	Edad/Sexo	Diagnóstico	Estadio FIGO *	Estadio TNM**
<i>Tumores de mama</i>				
1	50	Carcinoma intraductal	0	Tis N0 M0
2	60	Carcinoma papilar	IB	T1b N0 M0
3	65	Carcinoma ductal infiltrante	IB2	T1c N0 M0
4	68	Carcinoma ductal infiltrante	IB2	T1c N0 M0
5	75	Carcinoma ductal infiltrante	IB2	T1c N0 M0
6	66	Carcinoma ductal infiltrante	IIIB	T1b N2a M0
7	44	Carcinoma ductal infiltrante	IVA	T4d N3a M1
8	56	Carcinoma ductal infiltrante	IVA	T4d N3a M1
<i>Tumores de endometrio</i>				
1	55	Adenocarcinoma endometrioide de endometrio	IA	T1a N0 M0
2	79	Adenocarcinoma endometrioide de endometrio	II	T2 NX M0
3	78	Adenocarcinoma de endometrio	IIIA	T3 N0 M0
4	77	Adenocarcinoma de endometrio	IIIB	T3 N1 M0
<i>Tumores de ovario</i>				
1	37	Adenocarcinoma de células claras ovárico	IC	T1c N0 M0
2	48	Adenocarcinoma ovárico	IC	T1c N0 M0
3	52	Adenocarcinoma ovárico	IC	T1c N0 M0
4	53	Adenocarcinoma mucinoso	IC	T1c N0 M0

Resultados

5	53	Adenocarcinoma ovárico	IV	T4 NX M1
<i>Tumores de trompa</i>				
1	70	Carcinoma epitelial	IIIC	T3c N0 M0
<i>Tumores de cérvix</i>				
1	53	Carcinoma epidermoide	IIA	T2a N0 M0
2	66	Carcinoma epidermoide queratinizante	IIB	T2b N0 M0
3	69	Carcinoma epidermoide	IVB	T4 NX M1
<i>Tumores de útero</i>				
1	48	Leiomioma de alto grado	IB	T1b N0 M0

* Clasificación de estadio FIGO, desarrollada por la *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (Pecorelli, 2009).

** Clasificación TNM, desarrollada conjuntamente por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *Union for International Cancer Control* (UICC) (Edge and Compton, 2010).

La bibliografía también indica la expresión de CCR9 en muestras de melanomas y, sobre todo, en sus metástasis en intestino. Un estudio de Amersi et al. (2008) analizó mediante RT-qPCR tejido embebido en parafina de metástasis de melanoma localizadas en intestino. Hallaron expresión de CCR9 en 88 de 102 muestras analizadas (86%). También analizaron 23 tumores primarios de melanoma, encontrando que 11 de los 23 melanomas primarios (48%) eran CCR9⁺. Asimismo, existe un estudio de Chen et al. (2012) en el que se analizan muestras de tejido embebido en parafina mediante inmunohistoquímica. Mostraron que la expresión de CCR9 es mayor en adenomas de colon, decreciendo de forma progresiva en carcinomas invasivos y metastásicos. Observaron una expresión máxima de CCR9 en 46 muestras de *foci* adenomatoso, una expresión media en 19 carcinomas *in situ* y expresión negativa de este receptor en 86 carcinomas invasivos. Con estos antecedentes, en el presente estudio se incluyó el análisis, también mediante RT-qPCR, de muestras de tumores primarios de colon y de melanomas. Éstas proceden de pacientes que han cedido sus muestras de tejido excedentes de procedimientos terapéuticos y diagnósticos al Biobanco Ramón y Cajal. Las muestras se mantuvieron almacenadas en dicho Biobanco, congeladas en O.C.T. Los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en las **tablas 12 y 13**. Como puede observarse, se analizaron 13 muestras de adenocarcinomas de colon y 26 muestras de melanomas. De estos últimos, 23 correspondían a melanomas primarios y 3 a metástasis de melanoma.

Tabla 12. Información diagnóstica de los pacientes con adenocarcinoma de colon incluidos en el estudio

Caso	Edad/ Sexo	Diagnóstico	Estadio Astler- Coller*	Estadio TNM**
1	76/M	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon que infiltra la capa muscular externa sin llegar a afectar al tejido pericólico. 33 ganglios linfáticos subyacentes aislados sin infiltración tumoral	A	T2 N0 M0
2	73/F	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon que infiltra la musculatura propia. 52 ganglios linfáticos subyacentes aislados sin infiltración tumoral	A	T2 N0 M0
3	53/M	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon ascendente con componente mucinoso que infiltra la musculatura propia. Sin afectación de los ganglios linfáticos ni del pedículo vascular	A	T2 N0 M0
4	72/M	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon que infiltra la grasa pericólica. 7 ganglios linfáticos subyacentes aislados sin infiltración tumoral	B	n.d.
5	80/M	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon que infiltra hasta la serosa. Sin afectación linfática	B	T3 N0 M0
6	73/F	Adenocarcinoma bien diferenciado con componente mucinoso, sobre adenoma vellosos de colon ascendente, con infiltración del tejido pericólico. 8 ganglios linfáticos subyacentes aislados sin infiltración tumoral	B2	T3 N0 M0
7	81/M	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon descendente que infiltra el tejido pericólico. 13 ganglios linfáticos subyacentes aislados sin infiltración tumoral	B2	T3 N0 M0
8	72/F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado de colon ascendente que infiltra el tejido pericólico y metastatiza en 4 de los 11 ganglios linfáticos subyacentes aislados	C	T3 N1 M0
9	78/M	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon, que infiltra la grasa pericólica y metastatiza en 3 de los 19 ganglios linfáticos subyacentes aislados	C2	T3 N2 MX
10	82/F	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon de tipo mucinoso, que infiltra la grasa y el peritoneo pericólicos. Metástasis en 22 de los 25 ganglios linfáticos subyacentes aislados	C2	T3 N2 M0
11	74/F	Adenocarcinoma pobremente diferenciado de ciego y colon ascendente que infiltra el tejido pericólico con formación de implantes y metastatiza en los 22 ganglios linfáticos subyacentes aislados	C2	T3 N3 M0
12	51/M	Adenocarcinoma mucinoso de colon sigmoide que infiltra el tejido pericólico y metastatiza en 2 ganglios subyacentes aislados	C(D)	T3 N3 M1
13	77/M	Adenocarcinoma muy pobremente diferenciado de sigma perforado, que infiltra y engloba los segmentos adyacentes del colon	n.d.	n.d.

* Clasificación de estadio Astler-Coller, modificada a partir de la clasificación de Dukes (Astler and Coller, 1954).

** Clasificación TNM, desarrollada conjuntamente por el American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC) (Edge and Compton, 2010).

Tabla 13. Información diagnóstica de los pacientes con melanoma incluidos en el estudio

Caso	Edad/ Sexo	Diagnóstico	Estadio Clark*	Estadio TNM**
<i>Melanomas primarios</i>				
1	84/M	Melanoma de extensión superficial en fase de crecimiento radial, con áreas de regresión	I	n.d.
2	37/M	Melanoma de extensión superficial, con áreas de regresión. Espesor máximo de Breslow de 0.22 mm. Fase de crecimiento radial	II	T1 N0 M0
3	55/M	Melanoma de extensión superficial, en fase de crecimiento radial, con un espesor máximo de Breslow de 0,6 mm	II	T1 N0 M0
4	60/M	Melanoma de extensión superficial, con un espesor máximo de 0,35mm	II	n.d.
5	73/F	Melanoma de extensión superficial, que mide 0,8 mm de espesor máximo, con extensa regresión y no ulcerado	III	T1a NX M0
6	73/F	Melanoma de extensión superficial, con un espesor máximo de Breslow de 0.93 mm y extensas áreas de regresión	III	T1a NX M0
7	36/F	Melanoma de extensión superficial, de 0,69 mm de espesor de Breslow con bordes de resección libres de tumor	III	T1 NX M0
8	80/F	Melanoma de tipo histológico no clasificable, de un espesor de Breslow de 1,15 mm. no ulcerado	III	T2a NX M0
9	62/F	Melanoma de extensión superficial, de 1,12 mm de espesor máximo de Breslow, no ulcerado, que alcanza focalmente el borde quirúrgico periférico.	III	T2a NX M0
10	48/M	Melanoma nodular, con espesor máximo de 3mm	III	T3 NX M0
11	85/M	Melanoma nodular que mide 5 mm de espesor máximo, que presenta una extensa ulceración en superficie	III	T4b NX M0
12	58/M	Melanoma con extensión superficial, con un espesor máximo de Breslow de 1.94 mm	IV	T2 NX M0
13	74/F	Melanoma nodular con áreas de regresión completa en los bordes, extensamente ulcerado, con 3 mm de espesor máximo de Breslow	IV	T3 NX M1
14	79/M	Melanoma de tipo histológico no determinado, de 3,28 mm de espesor máximo de Breslow, extensamente ulcerado	IV	T3b NX M1
15	79/M	Melanoma de tipo histológico no determinado, de 3,28 mm de espesor máximo de Breslow, extensamente ulcerado	IV	T3b NX M1

16	63/M	Melanoma nodular, con un espesor máximo de 4mm, ulcerado	IV.	n.d.
17	73/F	Melanoma de tipo nodular, extensamente ulcerado, con un espesor máximo de 5mm	IV	n.d.
18	64/F	Melanoma nodular, ulcerado con un espesor máximo de 0,34 mm	IV	n.d.
19	63/M	Melanoma nodular, con un espesor máximo de 4mm, ulcerado	IV	n.d.
20	87/M	Melanoma de extensión superficial, con un espesor máximo de 6 mm, ulcerado, con afectación del borde de resección periférico	IV	T4b NX M1
21	89/F	Melanoma de tipo histológico no clasificable, extensamente ulcerado, de 3,5 cm de espesor máximo	n.d.	T3 NX MX
22	62/M	Melanoma nodular, extensamente ulcerado, de 15 mm de espesor máximo de Breslow	n.d.	T4 NX MX
23	79/F	Melanoma <i>in situ</i> de tipo lentigo maligno. No se ha observado infiltración en la muestra	n.d.	n.d.
Metástasis de melanoma				
24	87/F	Metástasis cutáneas de melanoma	n.d.	n.d.
25	64/M	Piel con tejido adiposo y ganglios linfáticos con metástasis de melanoma	n.d.	n.d.
26	66/M	Nódulo tumoral en tejido celular subcutáneo compatible histológicamente con metástasis por melanoma	n.d.	n.d.

* Clasificación de estadio de Clark (Clark et al., 1969).

** Clasificación TNM, desarrollada conjuntamente por el American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC) (Edge and Compton, 2010).

Como puede observarse en la **figura 25**, las muestras de tumores xenogénicos de células MOLT-4, desarrollados en ratones inmunodeficientes, que se emplearon como control positivo, resultaron CCR9 positivas en el análisis mediante RT-qPCR. No obstante, ninguna de las muestras de pacientes analizadas dio señales significativamente superiores al blanco del ensayo, correspondiente a la señal resultante del análisis de células Jurkat crecidas en cultivo.

Resultados

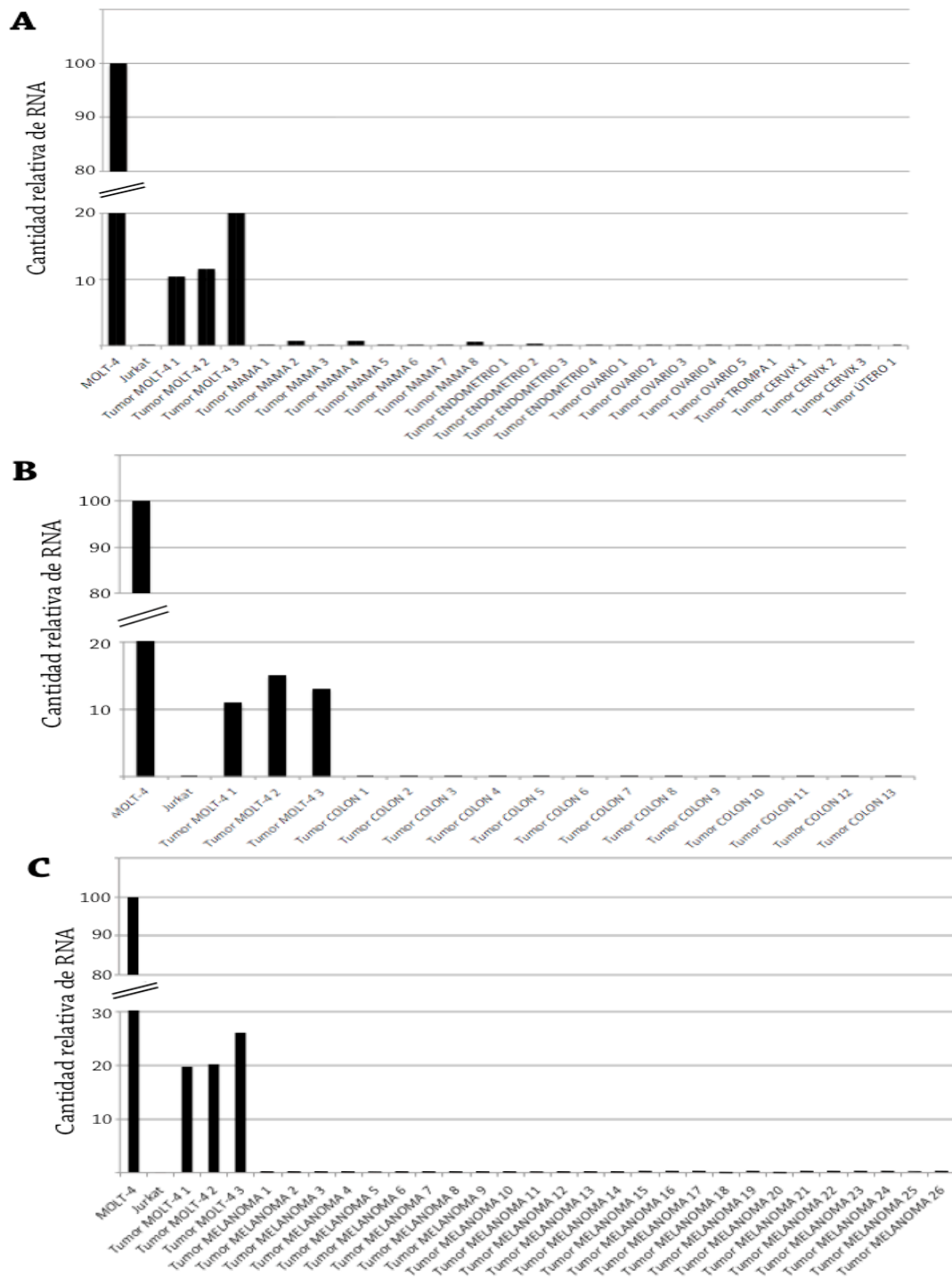


Figura 25. La expresión del receptor de quimioquinas CCR9 no se detectó en las muestras de tumores ginecológicos, de colon y melanomas analizadas mediante RT-qPCR.

Las muestras de tejido proceden de extirpaciones quirúrgicas realizadas con fines diagnósticos y/o terapéuticos. Se muestran los resultados obtenidos para la expresión de mRNA de hCCR9 normalizados respecto a la expresión del gen de referencia GAPDH, y expresados como cantidad relativa de RNA respecto a la obtenida en el mismo experimento para una muestra control positivo de células MOLT-4. Como control negativo se emplearon células Jurkat. Como control adicional también se incluyen tres muestras de tumores de células MOLT-4, crecidos de forma subcutánea en ratones BALB/c Rag2^{-/-} y conservadas en parafina u O.C.T. según el caso. **(A)** Análisis de la expresión de hCCR9 en tumores ginecológicos a partir de bloques de tejido embebido en parafina. **(B)** Análisis de la expresión de hCCR9 en adenocarcinomas de colon a partir de bloques de tejido congelado embebido en O.C.T. **(C)** Análisis de la expresión de hCCR9 en muestras de melanomas conservadas congeladas en O.C.T.

3.2 Estudio de la expresión de CCR9 en neoplasias hematológicas humanas

La expresión anómala de CCR9 también ha sido descrita en determinadas neoplasias hematológicas de células T CD4⁺. En individuos sanos, muy pocas células T CD4⁺ expresan CCR9, sin embargo, un estudio de (Qiuping et al., 2003) analiza 38 casos de leucemias de tipo T, 21 agudas y 17 crónicas. Un elevado porcentaje de las células T CD4⁺ en las leucemias T-ALL expresan CCR9, mientras que en el caso de las leucemias T-CLL, su expresión es muy escasa. En relación a las neoplasias hematológicas de tipo B, se ha encontrado una publicación que describe la expresión aberrante de CCR9 en determinados linfomas mediastinales de células B (Rehm et al., 2009).

En colaboración con facultativos del Hospital de Universitario de la Princesa, se analizaron 29 muestras de pacientes de diferentes neoplasias hematológicas. Los datos diagnósticos de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la **tabla 14**. En cada caso, se realizó un marcaje de las células para identificar la población de células patológicas mediante citometría de flujo. Para ello, se siguieron los criterios de los facultativos, quienes disponían de información sobre el fenotipo de la población patológica presente en cada muestra. La expresión de CCR9, dentro de dicha población patológica, se analizó mediante tinción con el mAb 91R o un mAb control isotípico (**Tabla 15**). En 5 casos se halló un marcaje anti CCR9 significativamente superior al obtenido con el mAb control. Correspondían a una leucemia aguda linfocítica de fenotipo mixto (caso 1), dos leucemias linfocíticas crónicas (casos 5 y 12), un síndrome linfoproliferativo B (caso 16), y un posible linfoma no Hodgkin de tipo B (caso 17). El porcentaje de células patológicas CCR9⁺ y el nivel de expresión del receptor variaron notablemente entre los distintos casos analizados, si bien en dos de ellos, más de la mitad de la población celular patológica sobreexpresa CCR9 (**Fig. 26**). A modo de ejemplo, en dicha figura, también se muestran dos casos en los que CCR9 no se encuentra sobreexpresado en la población celular patológica, corresponden a los casos 10 y 18 (leucemia linfática crónica y síndrome linfoproliferativo B de zona marginal, respectivamente).

Si bien deben analizarse más casos, pues el tamaño muestral es pequeño, según los resultados de este estudio, CCR9 puede considerarse una diana terapéutica para el tratamiento no sólo leucemias de tipo T CCR9⁺, sino también de ciertas neoplasias de células B.

Tabla 14. Información diagnóstica de los pacientes con neoplasias hematológicas incluidos en el estudio

Caso	Edad/Sexo	Muestra*	Diagnóstico
1	23/F	MO	Leucemia Linfocítica Aguda de fenotipo mixto
2	71/M	SP	Leucemia Mieloide Aguda
3	30/F	MO	Leucemia Linfocítica Aguda de células B
4	71/M*	MO	Leucemia Linfocítica Aguda de células B
5	79/F	SP	Leucemia Linfocítica Crónica
6	53/M	SP	Síndrome Linfoproliferativo B no concluyente
7	83/F	MO	Leucemia Linfocítica Crónica
8	58/	SP	Linfoma Linfocítico
9	70/M	SP	Leucemia Linfocítica Crónica
10	68/F	SP	Leucemia Linfocítica Crónica
11	71/F	MO	Posible Linfoma No Hodgkin de manto
12	64/M	SP	Leucemia Linfocítica Crónica
13	53/M	SP	Síndrome Linfoproliferativo B
14	65/M	SP	Leucemia Linfocítica Crónica
15	54/F	SP	Leucemia Prolinfocítica T
16	75/M	SP	Síndrome Linfoproliferativo B
17	67/F	SP	Posible Linfoma No Hodgkin
18	59/M	MO	Síndrome Linfoproliferativo B de zona marginal
19	72/M	SP	Leucemia Linfocítica Crónica atípica
20	88/F	SP	Leucemia Linfocítica Crónica atípica
21	66/M	SP	Leucemia Linfocítica Crónica
22	88/M	SP	Leucemia Linfocítica Crónica atípica
23	78/F	MO	Mieloma Múltiple
24	83/M	MO	Mieloma Múltiple
25	81/F	MO	Mieloma Múltiple
26	86/F	MO	Mieloma Múltiple
27	69/F	MO	Mieloma Múltiple
28	84/M	MO	Mieloma Múltiple
29	73/M	SP	Síndrome de Sézary

* MO (médula ósea); SP (sangre periférica).

Tabla 15. Análisis de la expresión de CCR9 en células de pacientes de neoplasias hematológicas

Caso	Población patológica	Fenotipo*	% Población patológica**	% Expresión CCR9***
1	Linfocitos T	CD34 ⁺	9,9	65
2	Mieloide	CD34 ⁺	67	-
3	Linfocitos B	CD34 ⁺ , CD19 ⁺	n.d.	-
4	Linfocitos B	CD34 ⁺ , CD19 ⁺	92	-
5	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	62	10,9
6	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	41	-
7	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	76	-
8	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	23	-
9	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	40	-
10	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	53	-
11	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	20	-
12	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	31	7,9
13	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	17	-
14	Linfocitos B	CD5 ⁺ , CD3 ⁻	13	-

15	Linfocitos T	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺	80	-
16	Linfocitos B	CD20 ⁺	16	66
17	Linfocitos B	CD20 ⁺	51	45
18	Linfocitos B	CD20 ⁺	15	-
19	Linfocitos B	CD20 ⁺	28	-
20	Linfocitos B	CD20 ⁺	10	-
21	Linfocitos B	CD19 ⁺	26	-
22	Linfocitos B	CD5 ^{debil} , CD20 ⁺	34	-
23	Células plasmáticas	CD38 ⁺	70	-
24	Células plasmáticas	CD38 ⁺	3	-
25	Células plasmáticas	CD38 ⁺	31	-
26	Células plasmáticas	CD38 ⁺	65	-
27	Células plasmáticas	CD38 ⁺	40	-
28	Células plasmáticas	CD38 ⁺	47	-
29	Linfocitos T	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD7 ^{debil}	31	-

* Se indica la información diagnóstica disponible para cada paciente.

** Porcentaje de población celular patológica, definida según el fenotipo indicado en cada caso, respecto a la población celular total de la muestra.

*** Expresión de CCR9 en la población celular patológica determinada mediante tinción con 91R.

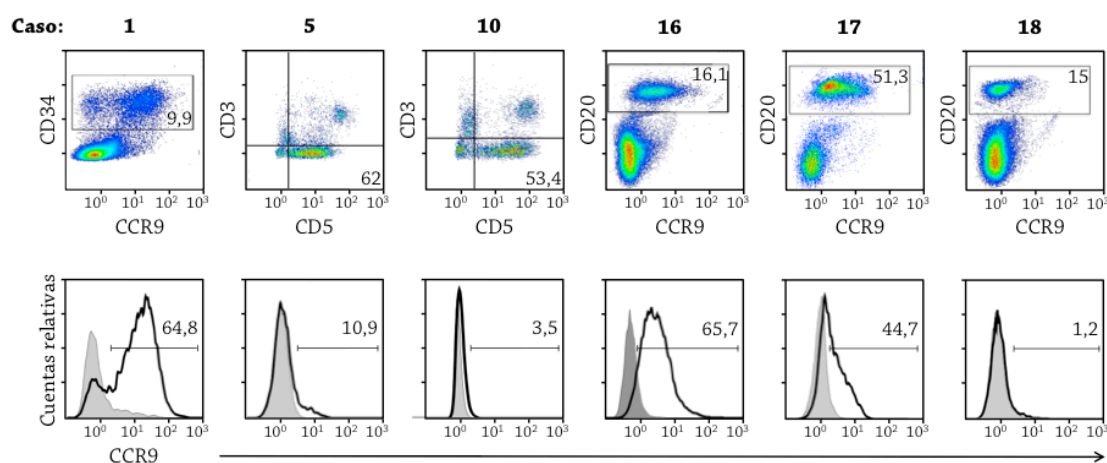


Figura 26. La expresión de CCR9 por las poblaciones celulares patológicas de las neoplasias hematológicas analizadas presenta una distribución heterogénea.

Análisis por citometría de flujo de la expresión de CCR9 en muestras de sangre periférica o de médula ósea de pacientes de neoplasias hematológicas. En cada caso, se seleccionó la población celular patológica según el marcaje indicado en la tabla 15. En los histogramas superiores se muestra la población de células sanguíneas totales y el *gate* correspondiente a las células consideradas como patológicas. Se indica el porcentaje de células patológicas respecto del total. En los histogramas inferiores se muestra la expresión de CCR9 dentro de las poblaciones seleccionadas como patológicas. Los histogramas vacíos corresponden a la tinción con 91R y los coloreados a la tinción con un mAb control isotípico. Se indica el porcentaje de células CCR9⁺ dentro de las poblaciones patológicas.

Discusión

1. Generación de mAb específicos frente a hCCR9

La supervivencia de los pacientes con cáncer ha aumentado de forma constante en los últimos años debido, en parte, al avance en los métodos de diagnóstico que permiten su detección temprana y también al desarrollo de nuevos fármacos para su uso en terapias dirigidas, incluyendo a los anticuerpos terapéuticos antitumorales. El presente trabajo se ha centrado en la generación y caracterización de mAb específicos frente al receptor de quimioquinas humano CCR9, y en el estudio de su potencial como agentes terapéuticos en inmunoterapia antitumoral.

La generación de mAb frente a receptores de quimioquinas no es un proceso sencillo. Los siete dominios transmembrana que forman estos receptores se encuentran embebidos en la membrana plasmática, quedando inaccesibles a los anticuerpos al igual que sus dominios intracelulares. Por tanto, para poder unirse al receptor expresado en la superficie de células tumorales CCR9⁺, los mAb han de estar dirigidos contra los dominios extracelulares (Klarenbeek, 2012). En el laboratorio se realizaron varios intentos previos de inmunización de ratones, con el objetivo de generar una buena respuesta inmune frente a hCCR9. Primero, empleando péptidos sintéticos que cubrían las secuencias completas de las cuatro regiones extracelulares de hCCR9. Después, utilizando ratones previamente tolerizados frente a células HEK-293 a los que se inmunizó con células HEK-293 transfectadas de manera estable con hCCR9. Ambas resultaron infructuosas. Como alternativa para la obtención de mAb que reconozcan los dominios extracelulares de hCCR9 se podría utilizar el receptor completo purificado, tanto para las inmunizaciones como para los ensayos de selección y caracterización de mAb. Sin embargo, dada la dificultad en la producción y purificación de este tipo de receptores en las cantidades necesarias y en su conformación nativa, se decidió inducir una respuesta inmune frente a hCCR9 mediante la inmunización de ratones con un plásmido de expresión de este receptor, combinada con dos dosis de recuerdo utilizando células hCCR9⁺ (Nagata et al., 2003).

Dos hibridomas obtenidos tras la inmunización génica, denominados 91R y 92R, se seleccionaron en base a su patrón de reconocimiento de células hCCR9⁺ para su clonación y estabilización. El mAb 91R es específico del receptor CCR9 humano y no reconoce a su ortólogo murino, pese a que ambos receptores tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del 86% (**Fig. 7A**) (Zaballos et al., 1999). Este mAb tampoco reconoce a ninguno de los cuatro receptores de quimioquinas humanos relacionados frente a los que se analizó, hCCR4, hCCR5, hCCR6 y hCCR8, los cuales tienen un 33-39% de identidad de secuencia con hCCR9. Asimismo, el mAb 91R detecta hCCR9 en células que expresan este receptor de forma endógena en un porcentaje de células e intensidad de señal concordantes con la bibliografía. Es el caso de timocitos humanos (Carramolino et al., 2001; Zaballos et al., 1999), células de sangre periférica (Zabel et al., 1999) y de la línea celular MOLT-4 de leucemia humana de células T (Yu et al., 2000; Zabel et al., 1999) (**Fig. 7B**). La especificidad de 91R también se ha confirmado mediante citometría de flujo, empleando células MOLT-4 con la expresión de hCCR9 silenciada, observándose una disminución del 70% de la unión de 91R a la superficie celular (**Fig. 8B**); y mediante inmunotransferencia, empleando células MOLT-4 y células HEK-293 transfectadas con hCCR9 o con un vector control (**Fig. 9**). Este último ensayo permitió observar, por primera vez, la N-glicosilación del receptor, para el cual se había predicho un sitio putativo de glicosilación en el residuo Asn32 de la

secuencia de hCCR9-A. En las líneas celulares humanas HEK-293 transfectadas con hCCR9 y MOLT-4, la cadena de azúcares de CCR9 tendría un peso molecular aparente de entre 3 y 7 kDa respectivamente. Los resultados obtenidos confirmaron que los mAb 91R y 92R, pese a haber sido generados empleando el receptor completo como inmunógeno, reconocen un epítipo peptídico de hCCR9 no conformacional, ya que también reconocen al receptor hCCR9 desnaturalizado y N-desglicosilado.

2. Reconocimiento del dominio N-terminal de hCCR9 por los mAb 91R y 92R

Se observó que los mAb 91R (IgG2b) y 92R (IgG2a), compiten entre sí tanto por su unión al receptor hCCR9 en conformación nativa como por el reconocimiento de un péptido sintético correspondiente a los aa 2-22 del dominio N-terminal de hCCR9 (**Fig. 11**). Estos dos mAb, por lo tanto, en ausencia de cambios conformacionales del receptor, deberían reconocer epítopos de CCR9 muy cercanos, superpuestos o idénticos.

Con el fin de identificar el epítipo preciso reconocido por cada uno de los mAb, se analizó su unión a un conjunto de péptidos sintéticos solapantes que cubren toda la secuencia del receptor, mediante la técnica Pepscan. Este ensayo permitió identificar una secuencia de 6 aminoácidos correspondiente a las posiciones 11-16 de la isoforma A de hCCR9 como el epítipo mínimo necesario para la unión tanto de 91R como de 92R. Como se ha mencionado, existen dos isoformas alternativas de hCCR9, denominadas A y B, ambas funcionales. La isoforma mayoritaria, hCCR9-A posee 12 aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal (**Fig 5A**). hCCR9-B, por tanto, carece de los dos primeros aminoácidos del epítipo mínimo identificado, necesario para el reconocimiento por 91R y 92R, y previsiblemente no sería reconocida por los mismos. La expresión relativa de cada una de las isoformas de hCCR9 ha sido previamente descrita por Yu y colaboradores. En dicho estudio se analizaron tanto líneas celulares como timocitos y células mononucleares de sangre periférica, y se muestra que, en todas las células analizadas, las isoformas hCCR9-A y hCCR9-B, se expresan en una proporción 10:1 (Yu et al., 2000). En base a esta información, la isoforma hCCR9A, reconocida por los mAb anti hCCR9 generados en nuestro laboratorio, correspondería a aproximadamente el 90% de las moléculas de CCR9 presentes en cada célula.

El dominio extracelular N-terminal de los receptores de quimioquinas presenta un alto grado de flexibilidad estructural y tiene un papel crucial en el reconocimiento inicial entre la correspondiente quimioquina y su receptor, así como en la especificidad y afinidad de la interacción (Szpakowska et al., 2012). La longitud y las secuencias de aminoácidos de las regiones N-terminal de los diferentes receptores varían considerablemente, aunque todos muestran un alto contenido en residuos cargados negativamente, que facilitan la interacción con las quimioquinas, las cuales, por contra, presentan un elevado porcentaje de aminoácidos cargados positivamente. Se dispone de poca información sobre la estructura de la región N-terminal de los receptores de quimioquina. CXCR4 es el único receptor de quimioquinas cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Wu et al., 2010). La conformación espacial del extremo N-terminal de CXCR4, sin embargo, no pudo determinarse, en línea con la hipótesis de su elevado grado de movilidad. Numerosos estudios, realizados con

receptores de quimioquinas completos (Colvin et al., 2006; Monteclaro and Charo, 1997; Prado et al., 2007), o con péptidos sintéticos derivados de sus secuencias (Duma et al., 2007; Rajagopalan and Rajarathnam, 2004; Veldkamp et al., 2006), han demostrado que el dominio N-terminal de los receptores de quimioquinas tiene un papel importante en la unión al ligando. Se ha observado que el mecanismo de unión de una quimioquina a su receptor se ajusta a un modelo con dos sitios de interacción. La unión inicial de la quimioquina a la región N-terminal del receptor produce un cambio de conformación del mismo tras el cual tiene lugar la interacción del ligando con las regiones transmembrana del receptor, activando las rutas de señalización intracelular (Gupta et al., 2001).

En base a la información disponible, se analizó si el mAb 91R podía bloquear la unión quimioquina-receptor y la señalización del receptor dependiente de la unión del ligando. Los resultados obtenidos indican que el ligando CCL25 compite parcialmente la unión de 91R a hCCR9, sugiriendo que esta quimioquina y el mAb podrían reconocer regiones del receptor parcialmente solapantes o muy próximas entre sí. Alternativamente, la unión de CCL25 a CCR9 podría modificar su conformación y afectar al reconocimiento del receptor por el mAb. Sin embargo, 91R no parece tener actividad antagonista de la señalización mediada por el eje CCL25/CCR9, ya que la migración en respuesta a un gradiente de CCL25 no se vio afectada por la preincubación de células MOLT-4 con el mAb 91R (**Fig. 10**).

Otros grupos han generado anticuerpos monoclonales frente a CCR9, siendo los más relevantes los mAb 3C3 y GPR96-1 (Zabel et al., 1999), protegidos en una patente de la empresa Millenium Pharmaceuticals (referencia: US7485301-B2). A diferencia de los anticuerpos 91R y 92R, dichos mAb son capaces de neutralizar *in vitro* la acción de CCR9, sin embargo, no se ha descrito si alguno de estos mAb puede ejercer acciones *in vivo*.

Se ha sugerido un potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades infecciosas, inflamatorias y cáncer, para moléculas antagonistas de la señalización de receptores de quimioquinas, incluyendo mAbs y moléculas orgánicas de bajo peso molecular (Szpakowska et al., 2012). Sin embargo, la actividad antagonista de los primeros no parece ser indispensable para generar mAb con aplicaciones clínicas. Es el caso del mAb humanizado mogamulizumab, KW-0761, autorizado en Japón para el tratamiento de leucemias/linfomas CCR4⁺. Este mAb fue generado por inmunización con un péptido correspondiente a los aa 2-29 de hCCR4 (Niwa et al., 2004). Las estrategias de inmunización con péptidos dan lugar a mAb que reconocen epítomos lineales que, por lo general, tienen baja afinidad y no presentan actividad antagonista (Hutchings et al., 2010). De hecho, el mAb KW-0761 no actúa bloqueando la señalización quimioquina-receptor, sino que ejerce su acción mediante potentes funciones efectoras, responsables de sus resultados clínicos favorables. El dominio Fc de este anticuerpo humanizado fue defucosilado con el fin de favorecer la ADCC, permitiendo así una eficiente eliminación de células T tumorales CCR4⁺. La pérdida de las cadenas de azúcares de KW-0761 aumenta la afinidad de su región Fc por el receptor FcγRIIIA expresado por las células NK, favoreciendo su reclutamiento, tal y como se ha observado en ensayos *ex vivo* y en modelos animales (Mizushima et al., 2011). Las características de KW-0761 confirman que el uso de mAb anti receptores de quimioquinas sin actividad antagonista, pero capaces de ejercer acciones

citotóxicas, puede ofrecer excelentes resultados terapéuticos. Por ello, pese a su falta de capacidad para bloquear la señalización del eje CCL25/CCR9, se decidió continuar con la caracterización de los mAb 91R y 92R y la evaluación de su actividad antitumoral.

3. Comparación de la secuencia y la afinidad por hCCR9 de los mAb 91R y 92R

La comparación de las secuencias de nucleótidos correspondientes a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los mAb 91R y 92R mostró una elevada similitud. Entre las regiones variables de las cadenas pesadas de estos mAb existen únicamente 10 nucleótidos diferentes y entre las regiones variables de las cadenas ligeras se encuentran 17 diferencias (**Fig. 15**). Esto sugiere un probable origen común para ambos mAb. Los hibridomas productores de 91R y 92R podrían derivar de un mismo linfocito B parental, ya que ambos presentan un patrón idéntico de reordenamiento de los segmentos génicos de la línea germinal. A partir de este linfocito parental, tras un proceso de hipermutación somática y cambio de isotipo, se habrían generado linfocitos productores de nuevas variantes de la inmunoglobulina original, dando lugar a los mAb identificados como 91R (IgG2b) y 92R (IgG2a).

Las diferencias entre las regiones variables de 91R y 92R se traducen, a nivel de aminoácidos, a 6 posiciones no conservadas entre ambas cadenas pesadas (sólo una incluida dentro de sus CDR) y a 12 posiciones no conservadas entre las ligeras (4 incluidas dentro de sus CDR) (**Fig. 16**). Estas escasas diferencias explicarían la gran similitud de afinidad por la unión al péptido correspondiente a las posiciones 2-22 de hCCR9-A, determinada mediante análisis de interacciones moleculares utilizando un biosensor SPR (**Fig. 12**).

El estudio de la constante de afinidad de un mAb por un receptor GPCR resulta complicado, debido a la dificultad de purificar y de mantener la conformación nativa de este tipo de proteínas sobre las superficies adecuadas para su análisis (Chu et al., 2014). Por ello, las constantes de afinidad aparente para los mAb 91R y 92R (0,9 nM y 2,3 nM, respectivamente) se calcularon a partir de ensayos en los que se empleó, representando a la proteína nativa, un péptido correspondiente a las posiciones 2-22 del dominio N-terminal de hCCR9. Se comprobó que la afinidad de los dos anticuerpos por el antígeno era similar en las dos orientaciones posibles del ensayo, empleando el mAb inmovilizado o en la fase móvil. Como los mAb se generaron frente a la molécula completa de hCCR9, es posible que existan otras interacciones del mAb con aminoácidos de CCR9 que en la conformación nativa del receptor podrían encontrarse próximos al epítipo lineal reconocido por 91R y 92R. Dichas interacciones podrían implicar diferencias en los valores de afinidad de los mAb 91R y 92R respecto a los obtenidos en el presente trabajo. Por ello, se están evaluando diferentes condiciones de solubilización del receptor y su expresión en partículas virales, con el fin de disponer de nuevos antígenos para su uso en análisis SPR similares a los realizados por otros grupos con receptores completos presentes en liposomas (Graneli, 2010) o en envueltas virales (Hoffman et al., 2000; Vega et al., 2011).

4. Modelado estructural de 91R y de sus interacciones con hCCR9

Con el objetivo de identificar los aminoácidos implicados en la interacción mAb-antígeno, se modelizó la estructura tridimensional de las regiones variables de las dos cadenas del mAb 91R, a partir de la información contenida en su secuencia de aminoácidos. Para ello, se emplearon dos programas bioinformáticos de predicción de estructura, RosettaAntibody (Sircar et al., 2009) y PIGS (Marcatili et al., 2008). Los métodos bioinformáticos de modelado estructural de anticuerpos han demostrado, pese a sus limitaciones, una elevada utilidad para este tipo de estudios. Representan una estrategia más rápida y menos costosa que la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear para la obtención de estructuras proteicas. Recientemente, Almagro y colaboradores realizaron una evaluación de cuatro métodos de modelización de estructura 3D de anticuerpos, incluyendo RosettaAntibody y PIGS. Utilizando estos cuatro métodos, se modelizaron nueve anticuerpos de estructura cristalográfica conocida, pero que aún no había sido incluida en la base de datos PDB (*Protein Data Bank*). Se demostró que, en general, los resultados obtenidos con los diferentes métodos eran bastante similares. En todos los casos, las conformaciones de las regiones “marco” y de las CDR L1, L2, L3, H1 y H2 se predijeron con elevada exactitud (RMSDs media $\approx 1,0$ Å), mientras que la exactitud se redujo a la hora de predecir la estructura de CDR H3 (RMSDs media $> 3,0$ Å) (Almagro et al., 2011). Este trabajo puso nuevamente de manifiesto la dificultad de la modelización de CDR-H3.

El programa PIGS, desarrollado por Tramontano y colaboradores, modeliza la estructura tridimensional del anticuerpo problema combinando las estructuras canónicas para los CDR L1-L2-L3-H1-H2 con los *loops* del CDR H3 hallados cristalográficamente para otros anticuerpos de secuencia homóloga (Marcatili et al., 2008). El programa RosettaAntibody, desarrollado por Gray y colaboradores, modeliza los *loops* de CDR-H3 optimizando la estructura angular del esqueleto proteico, y también tiene en cuenta la orientación relativa de los dominios VL y VH, así como las conformaciones de las cadenas laterales de cada aminoácido (Sircar et al., 2009). En el caso particular de 91R, la estrategia seguida por RosettaAntibody, que analiza más variables, resultó más completa para hallar una estructura modelo de este mAb.

En el presente trabajo también se emplearon métodos bioinformáticos para estudiar la interacción antígeno-anticuerpo a partir de las secuencias de aminoácidos del mAb 91R y de hCCR9. En este caso, al haberse demostrado previamente la unión de 91R a un péptido correspondiente a la secuencia de hCCR9, se pudieron emplear programas de modelización proteína-péptido, que dan lugar a predicciones más precisas que los programas que modelizan interacciones proteína-proteína. Los programas empleados fueron Pepsite2 (Trabuco et al., 2012) y Rosetta Flexpepdock (London et al., 2011). En general, se obtuvieron mejores valores de acoplamiento péptido-mAb cuando el modelo estructural del mAb de partida correspondía al generado con el programa RosettaAntibody en comparación con los obtenidos para el modelo generado con el programa PIGS. Por ello, se seleccionó el primero como el modelo probablemente más cercano a la estructura real de 91R, y es el que se muestra en la **figura 17**.

Los modelos obtenidos en este estudio ofrecen una explicación estructural de los datos experimentales. El análisis sistemático, mediante un ensayo Pepscan, de las posibles sustituciones de las 6 posiciones del epítipo de hCCR9 necesarios para la interacción

hCCR9-91R reveló la importancia de la carga negativa en la posición 16 de hCCR9 para la interacción con 91R (**Fig. 14A**). La interacción entre el péptido y 91R sólo es posible cuando dicha posición está ocupada por un ácido aspártico como en la molécula de hCCR9 o por un ácido glutámico. Dicha posición 16, según el modelo bioinformático, queda localizada muy próxima a dos aminoácidos cargados positivamente del CDR2 de VH de 91R, los aminoácidos K52 y H61 (**Fig 17C**). Es de suponer que esta interacción entre fuerzas electrostáticas opuestas sea un importante elemento que favorece la unión entre el mAb 91R y los péptidos que imitan la secuencia de la región amino de hCCR9. El análisis mediante Pepscan también reveló la importancia del grupo carboxiamida de la asparagina en la posición 12 de hCCR9 para la interacción 91R-hCCR9 (**Fig. 14A**). El modelo de interacción, también sugiere la formación de un puente de hidrógeno entre el -NH₂ del grupo carboxiamida de la asparagina 12 del péptido correspondiente a la secuencia de hCCR9 y el -OH de la tirosina 54 del CDR2 de VL de 91R (**Fig. 14D**). Este puente de hidrógeno, según los resultados obtenidos, sería por tanto clave para favorecer la interacción 91R-hCCR9. Para verificar esta hipótesis, podría llevarse a cabo la sustitución de las posiciones Asn12 y Asp16 en la secuencia de hCCR9 silvestre en ensayos de transfección. De este modo, se podría estudiar experimentalmente la interacción entre el mAb 91R y las distintas variantes del receptor hCCR9 expresado en la superficie celular, permitiendo la validación de los resultados obtenidos empleando péptidos sintéticos.

Los modelos generados bioinformáticamente en este estudio son de gran utilidad para el diseño de estrategias de modificación de 91R que permitirán mejorar su afinidad y estabilidad. También resultan necesarios para abordar el proceso de humanización de este anticuerpo.

5. Actividad antitumoral y mecanismos de acción de los mAb 91R y 92R

Varios autores, como ya se ha indicado anteriormente, han sugerido el potencial de los mAb dirigidos frente receptores de quimioquinas como herramientas terapéuticas (Klarenbeek, 2012; Szpakowska et al., 2012). La mayoría de los mAb que se están empleando actualmente como fármacos antitumorales ejercen su acción mediante la inducción de una respuesta por parte de células efectoras o del complemento (Scott et al., 2012). Por ello, se decidió analizar la capacidad de 91R y 92R de inducir ADCC y CDC *in vitro* utilizando como diana células hCCR9⁺, de leucemia linfoblástica de células T MOLT-4 (**Figs. 18 y 19**). En estos ensayos se confirmó que 91R y 92R son capaces, *in vitro*, de estimular la respuesta inmune frente a células hCCR9⁺, lo que nos llevó a estudiar su capacidad de inhibir el crecimiento de células humanas MOLT-4 implantadas en ratones inmunodeficientes Rag2^{-/-}. Los experimentos xenogénicos mostraron la potente actividad antitumoral *in vivo* de los dos mAb. Iniciando el tratamiento un día después de la inoculación de las células tumorales, se observó una reducción en la carga tumoral de un 91% en el caso de 91R en comparación con el tratamiento con un mAb control isotípico IgG2b; y de un 100% en el caso de 92R en comparación con el tratamiento con un mAb control isotípico IgG2a (**Fig. 20**). Las diferencias entre 91R y 92R en su capacidad de inducir ADCC y CDC *in vitro* y en su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral en los ensayos *in vivo* son muy reducidas y en ninguno de los casos resultan estadísticamente significativas.

El efecto inhibidor del crecimiento tumoral de 91R se mantuvo incluso en condiciones

experimentales más exigentes, iniciándose el tratamiento 7 días después de la inoculación de las células MOLT-4 (**Fig. 21**) o administrando un menor número de dosis de mAb a los ratones (**Fig. 22**). Gracias al uso de células MOLT-4 bioluminiscentes, fue posible detectar el efecto de 91R en las primeras fases del desarrollo del tumor, observándose una reducción significativa en su crecimiento a partir del día 12 tras la inoculación de las células MOLT-4.

Además de la reducción en el tamaño de los tumores xenogénicos, el tratamiento con 91R dio lugar a un aumento en la necrosis observada en dichos tumores y en el porcentaje de células apoptóticas, así como una reducción en el porcentaje de células proliferantes y en la vascularización tumoral (**Figs. 23 y 24**).

En los modelos estudiados, los mAb mostraron actividad sistémica y una alta eficiencia, dado que el crecimiento de los tumores subcutáneos se vió fuertemente afectado en respuesta a la administración intraperitoneal de reducidas dosis de los mismos. En un modelo muy similar al mostrado en este trabajo, Ishii y colaboradores obtuvieron una reducción del 62% en respuesta a un tratamiento con el mAb anti hCCR4 KW-0761. En su ensayo, se inocularon células S-YU, una línea celular de leucemia linfocítica aguda de células T humana, a ratones inmunodeficientes SCID, por vía. Se les administraron cuatro dosis de KW-0761 a intervalos semanales, iniciando el tratamiento una semana después de la inoculación tumoral (Ishii et al., 2010). La reducción del tamaño tumoral obtenida en nuestro modelo con MOLT-4 y cuatro dosis de 91R administrado siguiendo la misma pauta temporal fue del 64%. Si bien es cierto que la comparación ha de realizarse con la máxima cautela, pues se trata de diferentes modelos experimentales, el mAb murino 91R sin modificar, presentaría por tanto una eficiencia similar a la observada para KW-0761, un mAb humanizado y defucosilado para aumentar su capacidad de inducir ADCC, que actualmente se utiliza en Japón para tratar neoplasias hematológicas CCR4⁺.

Se tiene previsto estudiar el efecto de administrar 91R y 92R a células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo, en un modelo xenógrafo ortotópico, empleando tanto líneas celulares establecidas como células primarias CCR9⁺, obtenidas de muestras de pacientes de leucemias humanas, con el fin de obtener información con mayor valor predictivo sobre la eficacia terapéutica de estos mAb.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de ADCC y CDC sugieren que 91R podría ejercer su efecto sobre las células tumorales *in vivo* mediante una combinación de ambos mecanismos. Esta hipótesis es compatible con el hecho de que aunque los ratones Rag2^{-/-} carecen de linfocitos B y T, mantienen intactos el sistema de inmunidad innata y la vía del complemento (Shinkai et al., 1992). Se considera que los agentes terapéuticos que atacan a un tumor mediante diferentes mecanismos son más eficaces, ya que pueden utilizarse en dosis bajas y con una menor probabilidad de efectos secundarios adversos. Un ejemplo del uso de varios mecanismos de acción de forma simultánea, sería el del mAb rituximab, empleado para el tratamiento de linfomas CD20⁺, el cual elimina a las células B a través de inducción de apoptosis, CDC y ADCC (Bezombes et al., 2011). 91R y 92R podrían aumentar su eficiencia en la lisis de las células CCR9⁺ mediante su conjugación a agentes citotóxicos, tales como auristatina o radioisótopos, tal y como ya se ha realizado en algunos mAb actualmente en uso para el tratamiento de tumores hematológicos, como ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (anti CD20)

o brentuximab vedotin (anti CD30) (Morschhauser et al., 2007; Witzig et al., 2007).

En el análisis de los posibles mecanismos de acción de 91R y 92R aún ha de evaluarse el papel de otros mecanismos, tales como la fagocitosis mediada por macrófagos (Gul et al., 2014), la inducción directa de apoptosis (Shan et al., 1998) y la interrupción parcial de señales intracelulares mediadas por el eje CCL25/CCR9 (Johnson et al., 2010; Johnson-Holiday et al., 2011b; Sharma et al., 2010).

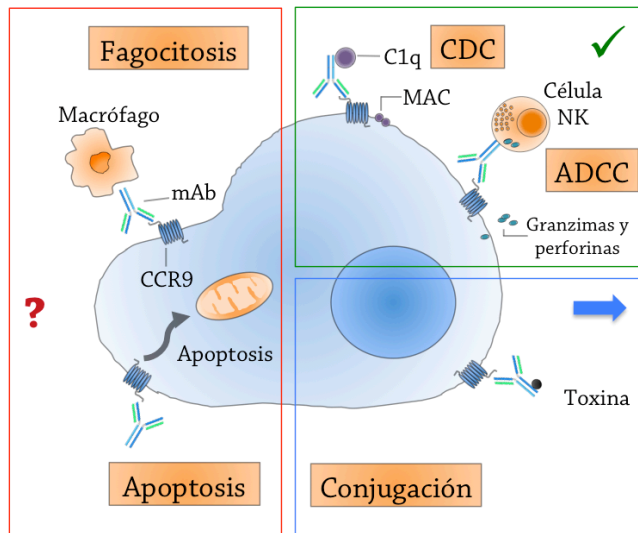


Figura 27. Posibles mecanismos de inducción de muerte de células tumorales mediados por 91R y 92R

Esquema de los mecanismos propuestos para la eliminación de células tumorales por los mAb 91R y 92R. Ensayos *in vitro* han mostrado actividad ADCC y CDC de 91R y 92R frente a células MOLT-4. Otros mecanismos potenciales de eliminación de células tumorales a estudiar son la inducción de apoptosis por unión de los mAb a hCCR9, y la fagocitosis mediada por mAb. También se evaluará su uso para el transporte dirigido de agentes citotóxicos a las células tumorales CCR9⁺.

6. Expresión de CCR9 en tumores humanos

Tras verificar la capacidad de los mAb 91R y 92R de inhibir el crecimiento tumoral, se estudió la expresión de CCR9 en muestras de tumores humanos, con el fin de identificar posibles aplicaciones terapéuticas de los mAb anti hCCR9.

Se analizaron muestras de tejido de melanomas primarios y de carcinomas de colon embebidos en OCT, y muestras de tejidos de tumores ginecológicos embebidos en parafina (**Fig. 25**). En todos los casos, los controles de expresión positiva fueron células MOLT-4 crecidas en cultivo y tumores xenogénicos de células MOLT-4 desarrollados en ratones, que fueron procesados de manera análoga a las muestras de los tumores humanos embebidos en O.C.T. o parafina, según el caso. Ninguna de las muestras de tumores sólidos humanos analizadas resultó positiva para la expresión de CCR9 mediante RT-qPCR.

Amersi y colaboradores estudiaron la expresión de CCR9 mediante RT-qPCR demostrando que CCR9 está presente en pocos melanomas primarios pero lo está en la mayoría de sus metástasis en intestino (Amersi et al., 2008). La expresión de CCL25 por las células del epitelio intestinal explicaría, según estos autores, la incidencia de metástasis intestinales derivadas de melanomas. En nuestro estudio solamente 3 de las 26 muestras de melanomas analizadas correspondían a metástasis, ninguna de las cuales procedía de intestino, lo que explicaría la ausencia de resultados positivos.

También se ha publicado, en base a técnicas de inmunohistoquímica, que los niveles de tinción frente a CCR9 son más elevados en adenomas y carcinomas de colon no invasivos que en sus estadios más avanzados (Chen et al., 2012). En este caso, los

autores sugieren que los carcinomas más agresivos pierden la expresión habitual de CCR9 por parte de estas células del epitelio intestinal, favoreciendo su capacidad de invadir otros tejidos y de metastatizar. Un último estudio describe, también mediante inmunohistoquímica, una mayor tinción frente a CCR9 en muestras de tejido pobre o moderadamente diferenciado de cáncer de mama con respecto al tejido no neoplásico correspondiente (Johnson-Holiday et al., 2011a). Es posible que la utilización de diferentes técnicas de detección de CCR9 entre los mencionados estudios y el nuestro, o bien el reducido tamaño muestral expliquen los resultados aparentemente contradictorios. Se considera necesario ampliar el tamaño muestral del estudio para los distintos tumores sólidos, así como determinar la expresión de CCR9 en los mismos mediante otras técnicas, para así poder extraer una conclusión sobre los niveles de expresión en melanomas, carcinomas de colon y tumores ginecológicos.

El estudio de la expresión de CCR9 en tejidos tumorales humanos también se llevó a cabo en muestras de pacientes de neoplasias hematológicas, confirmándose la expresión de CCR9 en células patológicas de este tipo de neoplasias (**Tabla 15**).

Debido a limitaciones en la disponibilidad de muestras, sólo se analizaron dos síndromes linfoproliferativos de células T, uno de ellos, el único de los cuales correspondía a un caso de leucemia linfocítica aguda, resultó ser CCR9⁺. En 2003, Quiping y colaboradores publicaron resultados del análisis de muestras de 38 pacientes de leucemia linfocítica de tipo T en los que se mostraba que CCR9 se expresaba en la mayoría de las células malignas CD4⁺ (Qiuping et al., 2003). Observaron que el nivel de expresión de CCR9 era elevado en comparación con el presente en células T CD4⁺ de sujetos sanos y que este incremento era más notable en las leucemias agudas que en las crónicas.

Finalmente, en el presente estudio se ha encontrado expresión de CCR9 en neoplasias de células B en 4 de los 19 casos analizados, lo que constituye una expresión anormal por parte de este tipo celular. Entre los casos CCR9⁺ encontrados se incluyen dos leucemias linfocíticas crónicas de células B, un síndrome linfoproliferativo B y un posible linfoma no Hodgkin. No hemos encontrado otras referencias bibliográficas que describan la expresión aberrante de CCR9 en leucemias de células B. En el caso de los linfomas, un reciente estudio de Wu y colaboradores, describió un aumento en la expresión de CCR9 en linfomas de células B intestinales con respecto a linfomas restringidos a los ganglios (Wu et al., 2014).

Los resultados obtenidos indican que los mAb frente a CCR9 presentan potencial terapéutico de para el tratamiento de neoplasias no sólo de tipo T, sino también de tipo B. No obstante, como se observa en la **figura 26**, el porcentaje de células CCR9⁺ y el grado de expresión del receptor son muy variables entre los diferentes casos. Aunque el 100% de las células neoplásicas no expresen el receptor, los mAb anti CCR9 podrían emplearse en estas neoplasias de forma combinada con otros fármacos, de modo que la eficacia global del tratamiento se vea incrementada.

7. Aplicaciones terapéuticas de los mAb anti CCR9

Es sabido que la desregulación del sistema de quimioquinas en las células tumorales y en su microambiente contribuye al desarrollo del cáncer (Klarenbeek, 2012; Mantovani et al., 2010; Sarvaiya et al., 2013; Zlotnik, 2004). Con esta premisa, muchas compañías farmacéuticas y grupos de investigación académica trabajan en proyectos centrados en el uso de las quimioquinas y sus receptores como dianas farmacológicas. Inicialmente, los programas de desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos frente al sistema quimioquina/receptor se centraron en el desarrollo de compuestos químicos de bajo peso molecular. No obstante, cada vez se dedican mayores esfuerzos al desarrollo de anticuerpos inhibidores o moduladores de la acción de estas moléculas (Scholten et al., 2012).

Los medicamentos basados en mAb tienen un desarrollo, producción y vía de administración más complejas y por tanto, son más costosos que los fármacos basados en pequeñas moléculas químicas. Sin embargo, los mAb presentan ventajas objetivas para su uso como fármacos terapéuticos. Estas ventajas se relacionan con su baja toxicidad, su mayor vida media en sangre, así como su capacidad para establecer interacciones específicas y de alta afinidad con otras moléculas o con células del sistema inmune. De hecho, son capaces de establecer un puente entre su antígeno diana, o las células portadoras de dicho antígeno, y la respuesta inmune celular innata o adquirida (Glassman and Balthasar, 2014). El área de anticuerpos terapéuticos está, pues, creciendo rápidamente, e incluye muchos de los medicamentos más empleados en la actualidad para el tratamiento del cáncer (rituximab, bevacizumab, trastuzumab) y enfermedades inflamatorias (adalimumab, infliximab) (Reichert and Dhimolea, 2012).

El eje CCR9/CCL25, además de su uso en onología, se ha empleado como diana para el tratamiento de enfermedades relacionadas con inflamación crónica. Mediante leucoferesis, empleando columnas con CCL25 conjugado a la fase sólida, se ha logrado eliminar de la circulación de manera eficaz y específica leucocitos que estaban siendo reclutados hacia el intestino. Esta estrategia ya se ha ensayado con éxito clínico en un paciente de colitis ulcerosa (Eberhardson et al., 2013). Una estrategia similar podría desarrollarse empleando columnas con mAb específicos anti CCR9 para el tratamiento de las fases agudas de enfermedades que conllevan procesos de inflamación intestinal, como puede ser la enfermedad de Crohn.

La seguridad y eficacia de los mAb terapéuticos utilizados en oncología varía dependiendo de la naturaleza del antígeno diana. Idealmente, éste debe ser abundante y accesible y además debe ser expresado de forma exclusiva y en la superficie de las células tumorales. La secreción del antígeno debería ser mínima, ya que los antígenos secretados en la circulación pueden unirse al mAb impidiendo la acción del mAb sobre el tumor (Scott et al., 2012). En teoría, al utilizar el eje CCL25/CCR9 como diana terapéutica, resultaría más ventajoso el uso de mAb frente al receptor CCR9 que frente a su quimioquina ligando. Esta aproximación permite la activación de una respuesta celular frente a las células tumorales. Además, si el mAb actuase como antagonista, el escenario sería óptimo, ya que se ha descrito que la unión de CCL25 a su receptor aumenta la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis en carcinomas de ovario, mama y próstata (Johnson et al., 2010; Johnson-Holiday et al., 2011b; Sharma et al., 2010); activa la cascada de señalización antiapoptótica de JNK1 (Qiuping et al., 2004) e induce proliferación celular al formar parte de la vía de señalización de Notch1

(Mirandola et al., 2012) en células de leucemia. Con anterioridad a nuestro trabajo, solamente se había descrito la utilización del eje CCR9/CCL25 como diana para inhibir el crecimiento de tumores humanos CCR9⁺ en dos modelos xenogénicos. En ambos casos la diana del tratamiento fue la quimioquina CCL25 y los resultados, aunque positivos, resultaron bastante limitados. En el primero de ellos, se empleó un mAb anti CCL25 que bloquea la vía de señalización a través de CCR9, en combinación con un agente citotóxico etopósido, en un modelo xenógrafo con una línea celular humana CCR9⁺ (Sharma et al., 2010). En el segundo, se empleó la quimioquina CCL25 acoplada a la toxina PE38 para tratar tumores xenógrafos de células MOLT-4 (Hu et al., 2011).

La expresión de CCR9 por determinadas células tumorales humanas debe ser estudiada en mayor profundidad, si bien los datos de la bibliografía describen su expresión en diversos tumores sólidos (mama, ovario, metástasis de melanoma, adenomas de colon) así como en neoplasias hematológicas de células T (Amersi et al., 2008; Chen et al., 2012; Johnson et al., 2010; Johnson-Holiday et al., 2011a; Qiuping et al., 2003). Los resultados de la presente tesis amplían este listado a algunas neoplasias de células B (**Tabla 15, Fig. 26**). Es importante indicar que en individuos adultos sanos, el número de células que expresan CCR9 es muy reducido. Se limita a una expresión residual en el timo (Zaballos et al., 1999), a algunas células T y dendríticas infiltrantes en el intestino (Kunkel et al., 2000), y a menos del 3% de los linfocitos circulantes (Zabel et al., 1999). Por ello, es de esperar que los efectos secundarios no deseados resultantes de eliminar dichas células sanas sean insignificantes en comparación con los beneficios de eliminar las células tumorales CCR9⁺. Si bien es necesaria una mayor investigación sobre los posibles tumores frente a los que se podrían emplear mAb anti CCR9 como terapia, parece claro que debe considerarse en primer lugar a los pacientes con neoplasias hematológicas, tanto de células B como T, como candidatos a beneficiarse de una terapia específica basada en mAb frente a este receptor.

La incidencia de las neoplasias hematológicas linfoides en Europa se sitúa en 24,5 casos por cada 100.000 habitantes y año (Sant et al., 2010). En el caso de las leucemias linfocíticas agudas y los linfomas linfocíticos, existe un pico de incidencia en la franja de edad de 0 a 14 años, que decrece en edades adultas y vuelve a incrementarse a partir de los 55 años. El tratamiento de la leucemia linfocítica aguda infantil incluye, normalmente, quimioterapia administrada durante entre 2 y 3 años. La tasa de supervivencia general a 5 años ha aumentado durante los últimos años a cerca del 90% en los niños menores de 15 años y a más de 75% en los adolescentes de 15 a 19 años (Hunger et al., 2012). Sin embargo, siguen siendo necesarios nuevos tratamientos que mejoren la tasa de curación y reduzcan la toxicidad. Respecto al resto de neoplasias hematológicas, la tasa de incidencia, en general, se incrementa con la edad. Debido a la comorbilidad, frecuente en los ancianos de estas patologías, es frecuente que los pacientes de edades avanzadas no se beneficien de intervenciones como la quimioterapia y radioterapia, por su elevada toxicidad (Hassan and Abedi-Valugerdi, 2014). En este sentido, los mAb terapéuticos específicos representan una alternativa para este tipo de pacientes de neoplasias hematológicas.

Según se avanza en la aprobación de nuevos mAb terapéuticos por las correspondientes autoridades regulatorias, la posibilidad de combinar varios mAb para mejorar la eficacia terapéutica parece un futuro cada vez más próximo en el campo de la oncología. La principal ventaja de utilizar combinaciones de mAb, en comparación

con el uso de la quimioterapia o radioterapia clásica, es la baja toxicidad de los mAb, la cual no debería incrementarse por el hecho de combinar más de un mAb. Los criterios de selección de la mejor combinación de mAb variarán en función del tipo tumoral y la función biológica del mAb. Por ejemplo, pueden combinarse mAb dirigidos frente a diferentes antígenos expresados diferencialmente por diferentes células de un mismo tumor, o dirigidos frente a múltiples antígenos expresado por una misma célula tumoral. Los distintos mAb terapéuticos pueden actuar de forma sinérgica, especialmente si presentan diferentes mecanismos de acción para la eliminación de las células tumorales (Reff et al., 2002). En este contexto, los mAb anti CCR9 descritos en el presente trabajo, una vez humanizados y optimizados para su uso clínico, pueden ser de utilidad en el horizonte de la medicina personalizada.

Conclusiones

1. Los anticuerpos monoclonales 91R y 92R, generados mediante inmunización génica, reconocen de manera específica al receptor de quimioquinas humano CCR9.
2. Los anticuerpos 91R y 92R, reconocen a CCR9 humano en su conformación nativa sobre la superficie de células que lo expresan de forma endógena o transfectada. El anticuerpo 91R también reconoce a CCR9 desnaturalizado y N-desglicosilado.
3. Los anticuerpos 91R, de isotipo IgG2b, y 92R, de isotipo IgG2a, tienen un porcentaje de identidad de secuencia de un 95% entre sus regiones variables de la cadena pesada y de un 89% entre las regiones variables de la cadena ligera.
4. Los anticuerpos 91R y 92R reconocen a una secuencia lineal de aminoácidos, correspondiente a los residuos situados en las posiciones 11-16 del dominio extracelular de la isoforma A de CCR9 humano. Esta secuencia está formada por los aminoácidos PNMADD y constituye el epítipo mínimo que es reconocido por ambos anticuerpos. La afinidad aparente de los anticuerpos 91R y 92R, por un péptido que incluye dicha secuencia, es de 0,9 y 2,3 nM, respectivamente.
5. Los aminoácidos Asn12 y Asp16 de la secuencia de CCR9 interactúan mediante puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas, respectivamente, con las regiones CDR de las cadenas pesada y ligera del mAb 91R, resultando fundamentales para la unión antígeno-anticuerpo.
6. Los anticuerpos 91R y 92R, en ensayos *in vitro*, son capaces de mediar la lisis de células CCR9 positivas, tanto dependiente de complemento como de células *natural killer*.
7. Los anticuerpos 91R y 92R inhiben el crecimiento de tumores xenogénicos humanos de células de la línea de leucemia T MOLT-4, que expresan el receptor CCR9 de forma endógena, inoculadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes en linfocitos T y B.
8. El anticuerpo 91R promueve apoptosis y necrosis intratumoral, y reduce la proliferación celular y la angiogénesis en los tumores xenogénicos de células MOLT-4 desarrollados en dichos ratones inmunodeficientes.
9. El receptor de quimioquinas CCR9 se expresa en el 17% de las neoplasias hematológicas humanas analizadas en este estudio. Su expresión se ha observado en células patológicas de leucemia linfocítica aguda de fenotipo mixto, de leucemia linfocítica crónica de células B, de síndrome linfoproliferativo B y de un posible linfoma no Hodgkin.
10. Los anticuerpos 91R y 92R presentan potencial como herramientas para el tratamiento, una vez humanizados, de tumores humanos CCR9 positivos

Bibliografía

- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology* 8, 639-646.
- Adams, G.P., and Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature biotechnology* 23, 1147-1157.
- Allegretti, M., Cesta, M.C., Garin, A., and Proudfoot, A.E. (2012). Current status of chemokine receptor inhibitors in development. *Immunology letters* 145, 68-78.
- Almagro, J.C., Beavers, M.P., Hernandez-Guzman, F., Maier, J., Shaulsky, J., Butenhof, K., Labute, P., Thorsteinson, N., Kelly, K., Teplyakov, A., *et al.* (2011). Antibody modeling assessment. *Proteins* 79, 3050-3066.
- Álvarez-Vallina, L.E. (2004). *Anticuerpos monoclonales. Realidades y perspectivas.* Editorial Complutense.
- Amersi, F.F., Terando, A.M., Goto, Y., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., Tran, A.N., Faries, M.B., Morton, D.L., and Hoon, D.S. (2008). Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 638-645.
- Astler, V.B., and Collier, F.A. (1954). The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Annals of surgery* 139, 846-852.
- Bachelierie, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A.M., Combadiere, C., Farber, J.M., Graham, G.J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A.H., Locati, M., Luster, A.D., *et al.* (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 66, 1-79.
- Balabanian, K., Levoye, A., Klemm, L., Lagane, B., Hermine, O., Harriague, J., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., and Bachelierie, F. (2008). Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *The Journal of clinical investigation* 118, 1074-1084.
- Balkwill, F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in cancer biology* 14, 171-179.
- Balkwill, F.R. (2012). The chemokine system and cancer. *The Journal of pathology* 226, 148-157.
- Barbero, S., Bonavia, R., Bajetto, A., Porcile, C., Pirani, P., Ravetti, J.L., Zona, G.L., Spaziante, R., Florio, T., and Schettini, G. (2003). Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer research* 63, 1969-1974.
- Barlow, D.J., Edwards, M.S., and Thornton, J.M. (1986). Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 322, 747-748.
- Bendall, L.J., Baraz, R., Juarez, J., Shen, W., and Bradstock, K.F. (2005). Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1alpha in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer research* 65, 3290-3298.
- Bertolini, F., Dell'Agnola, C., Mancuso, P., Rabascio, C., Burlini, A., Monestiroli, S., Gobbi, A., Pruneri, G., and Martinelli, G. (2002). CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer research* 62, 3106-3112.

- Bezombes, C., Fournie, J.J., and Laurent, G. (2011). Direct effect of rituximab in B-cell-derived lymphoid neoplasias: mechanism, regulation, and perspectives. *Molecular cancer research : MCR* 9, 1435-1442.
- Bhutani, D., and Vaishampayan, U.N. (2013). Monoclonal antibodies in oncology therapeutics: present and future indications. *Expert opinion on biological therapy* 13, 269-282.
- Bibeau, F., Lopez-Crapez, E., Di Fiore, F., Thezenas, S., Ychou, M., Blanchard, F., Lamy, A., Penault-Llorca, F., Frebourg, T., Michel, P., *et al.* (2009). Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 1122-1129.
- Blank, C.U. (2014). The perspective of immunotherapy: new molecules and new mechanisms of action in immune modulation. *Current opinion in oncology* 26, 204-214.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., *et al.* (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *The Journal of experimental medicine* 187, 129-134.
- Brennecke, P., Arlt, M.J., Campanile, C., Husmann, K., Gvozdenovic, A., Apuzzo, T., Thelen, M., Born, W., and Fuchs, B. (2014). CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice. *Clinical & experimental metastasis* 31, 339-349.
- Burger, J.A., and Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761-1767.
- Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., *et al.* (1999). The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 400, 776-780.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Carramolino, L., Kremer, L., Goya, I., Varona, R., Buesa, J.M., Gutierrez, J., Zaballos, A., Martinez, A.C., and Marquez, G. (1999). Down-regulation of the beta-chemokine receptor CCR6 in dendritic cells mediated by TNF-alpha and IL-4. *Journal of leukocyte biology* 66, 837-844.
- Carramolino, L., Zaballos, A., Kremer, L., Villares, R., Martin, P., Ardavin, C., Martinez, A.C., and Marquez, G. (2001). Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood* 97, 850-857.
- Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature reviews Cancer* 1, 118-129.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood* 99, 754-758.
- Chamorro, S., Vela, M., Franco-Villanueva, A., Carramolino, L., Gutierrez, J., Gomez, L., Lozano, M., Salvador, B., Garcia-Gallo, M., Martinez, A.C., *et al.* (2014).

- Antitumor effects of a monoclonal antibody to human CCR9 in leukemia cell xenografts. *mAbs* 6, 1000-1012.
- Chang, D.K., Sui, J., Geng, S., Muvaffak, A., Bai, M., Fuhlbrigge, R.C., Lo, A., Yammanuru, A., Hubbard, L., Sheehan, J., *et al.* (2012). Humanization of an anti-CCR4 antibody that kills cutaneous T-cell lymphoma cells and abrogates suppression by T-regulatory cells. *Molecular cancer therapeutics* 11, 2451-2461.
- Chen, H.J., Edwards, R., Tucci, S., Bu, P., Milsom, J., Lee, S., Edelmann, W., Gumus, Z.H., Shen, X., and Lipkin, S. (2012). Chemokine 25-induced signaling suppresses colon cancer invasion and metastasis. *The Journal of clinical investigation* 122, 3184-3196.
- Chen, J.S., Lan, K., and Hung, M.C. (2003). Strategies to target HER2/neu overexpression for cancer therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 6, 129-136.
- Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., Tulip, W.R., *et al.* (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883.
- Chu, R., Reczek, D., and Brondyk, W. (2014). Capture-stabilize approach for membrane protein SPR assays. *Scientific reports* 4, 7360.
- Clark, W.H., Jr., From, L., Bernardino, E.A., and Mihm, M.C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research* 29, 705-727.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443-446.
- Cohen, A.D., Boyer, J.D., and Weiner, D.B. (1998). Modulating the immune response to genetic immunization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12, 1611-1626.
- Coiffier, B., Lefebvre, S., Pedersen, L.M., Gadeberg, O., Fredriksen, H., van Oers, M.H., Wooldridge, J., Kloczko, J., Holowiecki, J., Hellmann, A., *et al.* (2008). Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood* 111, 1094-1100.
- Colvin, R.A., Campanella, G.S., Manice, L.A., and Luster, A.D. (2006). CXCR3 requires tyrosine sulfation for ligand binding and a second extracellular loop arginine residue for ligand-induced chemotaxis. *Molecular and cellular biology* 26, 5838-5849.
- Cragg, M.S., and Glennie, M.J. (2004). Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103, 2738-2743.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., *et al.* (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 351, 337-345.
- Darash-Yahana, M., Pikarsky, E., Abramovitch, R., Zeira, E., Pal, B., Karplus, R., Beider, K., Avniel, S., Kasem, S., Galun, E., *et al.* (2004). Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1240-1242.
- Debnath, B., Xu, S., Grande, F., Garofalo, A., and Neamati, N. (2013). Small molecule inhibitors of CXCR4. *Theranostics* 3, 47-75.

- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., and Golay, J. (2003). Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol* 171, 1581-1587.
- Duma, L., Haussinger, D., Rogowski, M., Lusso, P., and Grzesiek, S. (2007). Recognition of RANTES by extracellular parts of the CCR5 receptor. *Journal of molecular biology* 365, 1063-1075.
- Dunkelberger, J.R., and Song, W.C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research* 20, 34-50.
- Eberhardson, M., Marits, P., Jones, M., Jones, P., Karlen, P., Karlsson, M., Cotton, G., Woznica, K., Maltman, B., Glise, H., *et al.* (2013). Treatment of inflammatory bowel disease by chemokine receptor-targeted leukapheresis. *Clinical immunology* 149, 73-82.
- Edge, S.B., and Compton, C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology* 17, 1471-1474.
- Ehrlich, P. (1906). *Collected studies on immunity*. J Wiley & sons, 1-586.
- Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews Cancer* 8, 579-591.
- Ferenczi, K., Fuhlbrigge, R.C., Pinkus, J., Pinkus, G.S., and Kupper, T.S. (2002). Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *The Journal of investigative dermatology* 119, 1405-1410.
- Furusato, B., Mohamed, A., Uhlen, M., and Rhim, J.S. (2010). CXCR4 and cancer. *Pathology international* 60, 497-505.
- Garin, A., and Proudfoot, A.E. (2011). Chemokines as targets for therapy. *Experimental cell research* 317, 602-612.
- Gelmini, S., Mangoni, M., Castiglione, F., Beltrami, C., Pieralli, A., Andersson, K.L., Fambrini, M., Taddei, G.L., Serio, M., and Orlando, C. (2009). The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer. *Clinical & experimental metastasis* 26, 261-268.
- Glassman, P.M., and Balthasar, J.P. (2014). Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer biology & medicine* 11, 20-33.
- Glassy, M.C. (1993). Production methods for generating human monoclonal antibodies. *Human antibodies and hybridomas* 4, 154-165.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., *et al.* (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer research* 69, 2000-2009.
- Goldsmith, Z.G., and Dhanasekaran, D.N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26, 3122-3142.
- Goya, I., Gutierrez, J., Varona, R., Kremer, L., Zaballo, A., and Marquez, G. (1998). Identification of CCR8 as the specific receptor for the human beta-chemokine I-309: cloning and molecular characterization of murine CCR8 as the receptor for TCA-3. *J Immunol* 160, 1975-1981.
- Graneli, A. (2010). Incorporation of a transmembrane protein into a supported 3D-matrix of liposomes for SPR studies. *Methods Mol Biol* 627, 237-248.
- Green, L.L. (1999). Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods* 231, 11-23.

- Gul, N., Babes, L., Siegmund, K., Korthouwer, R., Bogels, M., Braster, R., Vidarsson, G., ten Hagen, T.L., Kubes, P., and van Egmond, M. (2014). Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *The Journal of clinical investigation* 124, 812-823.
- Gupta, S.K., Lysko, P.G., Pillarisetti, K., Ohlstein, E., and Stadel, J.M. (1998). Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *The Journal of biological chemistry* 273, 4282-4287.
- Gupta, S.K., Pillarisetti, K., Thomas, R.A., and Aiyar, N. (2001). Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1 α : implications for development of selective CXCR4 antagonists. *Immunology letters* 78, 29-34.
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., *et al.* (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England journal of medicine* 369, 134-144.
- Hassan, M., and Abedi-Valugerdi, M. (2014). Hematologic malignancies in elderly patients. *Haematologica* 99, 1124-1127.
- Hoffman, T.L., Canziani, G., Jia, L., Rucker, J., and Doms, R.W. (2000). A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: binding of antibodies and HIV-1 Env to chemokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11215-11220.
- Hornbeck, P., Fleisher, T.A., and Papadopoulos, N.M. (2001). Isotype determination of antibodies. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al] *Chapter 2, Unit 2 2*.
- Horton, H.M., Bennett, M.J., Pong, E., Peipp, M., Karki, S., Chu, S.Y., Richards, J.O., Vostiar, I., Joyce, P.F., Repp, R., *et al.* (2008). Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer research* 68, 8049-8057.
- Hu, Y., Zhang, L., Wu, R., Han, R., Jia, Y., Jiang, Z., Cheng, M., Gan, J., Tao, X., and Zhang, Q. (2011). Specific killing of CCR9 high-expressing acute T lymphocytic leukemia cells by CCL25 fused with PE38 toxin. *Leukemia research* 35, 1254-1260.
- Hudis, C.A. (2007). Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *The New England journal of medicine* 357, 39-51.
- Hughes, B. (2010). Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? *Nature reviews Drug discovery* 9, 665-667.
- Hunger, S.P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B.M., Gaynon, P.S., Winick, N.J., Reaman, G.H., and Carroll, W.L. (2012). Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 1663-1669.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., *et al.* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 350, 2335-2342.
- Hutchings, C.J., Koglin, M., and Marshall, F.H. (2010). Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *mAbs* 2, 594-606.

- Ishida, T., Inagaki, H., Utsunomiya, A., Takatsuka, Y., Komatsu, H., Iida, S., Takeuchi, G., Eimoto, T., Nakamura, S., and Ueda, R. (2004). CXC chemokine receptor 3 and CC chemokine receptor 4 expression in T-cell and NK-cell lymphomas with special reference to clinicopathological significance for peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 5494-5500.
- Ishida, T., Utsunomiya, A., Iida, S., Inagaki, H., Takatsuka, Y., Kusumoto, S., Takeuchi, G., Shimizu, S., Ito, M., Komatsu, H., *et al.* (2003). Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 3625-3634.
- Ishii, T., Ishida, T., Utsunomiya, A., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Imada, K., Uchiyama, T., Akinaga, S., *et al.* (2010). Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 1520-1531.
- Johnson, E.L., Singh, R., Johnson-Holiday, C.M., Grizzle, W.E., Partridge, E.E., Lillard, J.W., Jr., and Singh, S. (2010). CCR9 interactions support ovarian cancer cell survival and resistance to cisplatin-induced apoptosis in a PI3K-dependent and FAK-independent fashion. *Journal of ovarian research* 3, 15.
- Johnson-Holiday, C., Singh, R., Johnson, E., Singh, S., Stockard, C.R., Grizzle, W.E., and Lillard, J.W., Jr. (2011a). CCL25 mediates migration, invasion and matrix metalloproteinase expression by breast cancer cells in a CCR9-dependent fashion. *International journal of oncology* 38, 1279-1285.
- Johnson-Holiday, C., Singh, R., Johnson, E.L., Grizzle, W.E., Lillard, J.W., Jr., and Singh, S. (2011b). CCR9-CCL25 interactions promote cisplatin resistance in breast cancer cell through Akt activation in a PI3K-dependent and FAK-independent fashion. *World journal of surgical oncology* 9, 46.
- Jung, J. (2014). Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicological research* 30, 1-5.
- Kabat, D.K., E.A., Wu, T.T., Perry, H.H., Gottesman, K.S., Foeller, C (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH 5th edn.
- Kim, R. (2009). Cetuximab and panitumumab: are they interchangeable? *The Lancet Oncology* 10, 1140-1141.
- Klarenbeek, A.M., D; Blanchetot, C; Saunders, M; van der Woning, S; Smit, M; de Haard, H; Hofman, E (2012). Targeting chemokines and chemokine receptors with antibodies. *Drug Discovery Today: Technologies* 9.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kremer, L., and Marquez, G. (2004). Generation of monoclonal antibodies against chemokine receptors. *Methods Mol Biol* 239, 243-260.
- Kubota, T., Niwa, R., Satoh, M., Akinaga, S., Shitara, K., and Hanai, N. (2009). Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer science* 100, 1566-1572.
- Kuhne, M.R., Mulvey, T., Belanger, B., Chen, S., Pan, C., Chong, C., Cao, F., Niekro, W., Kempe, T., Henning, K.A., *et al.* (2013). BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in

- vivo in hematologic malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 357-366.
- Kunkel, E.J., Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Vierra, M.A., Goodman, S.B., Genovese, M.C., *et al.* (2000). Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *The Journal of experimental medicine* 192, 761-768.
- Kuroda, D., Shirai, H., Jacobson, M.P., and Nakamura, H. (2012). Computer-aided antibody design. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 25, 507-521.
- Kyi, C., and Postow, M.A. (2014). Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. *FEBS letters* 588, 368-376.
- Laskowski, R.A., and Swindells, M.B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of chemical information and modeling* 51, 2778-2786.
- Lazennec, G., and Richmond, A. (2010). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in molecular medicine* 16, 133-144.
- Li, A., King, J., Moro, A., Sugi, M.D., Dawson, D.W., Kaplan, J., Li, G., Lu, X., Strieter, R.M., Burdick, M., *et al.* (2011). Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer. *The American journal of pathology* 178, 1340-1349.
- Li, S., Schmitz, K.R., Jeffrey, P.D., Wiltzius, J.J., Kussie, P., and Ferguson, K.M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer cell* 7, 301-311.
- Lonberg, N., Taylor, L.D., Harding, F.A., Trounstein, M., Higgins, K.M., Schramm, S.R., Kuo, C.C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J.G., *et al.* (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856-859.
- London, N., Raveh, B., Cohen, E., Fathi, G., and Schueler-Furman, O. (2011). Rosetta FlexPepDock web server--high resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic acids research* 39, W249-253.
- Lu, X., and Kang, Y. (2009). Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. *The Journal of biological chemistry* 284, 29087-29096.
- Lu, Y., Chen, Q., Corey, E., Xie, W., Fan, J., Mizokami, A., and Zhang, J. (2009). Activation of MCP-1/CCR2 axis promotes prostate cancer growth in bone. *Clinical & experimental metastasis* 26, 161-169.
- Mantovani, A., Savino, B., Locati, M., Zammataro, L., Allavena, P., and Bonecchi, R. (2010). The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine & growth factor reviews* 21, 27-39.
- Marcatili, P., Rosi, A., and Tramontano, A. (2008). PIGS: automatic prediction of antibody structures. *Bioinformatics* 24, 1953-1954.
- Martin-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbi, A.L., and Toribio, M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 115, 5366-5375.

- Mashino, K., Sadanaga, N., Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Shibuta, K., Inoue, H., and Mori, M. (2002). Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer research* 62, 2937-2941.
- Matsuo, Y., Raimondo, M., Woodward, T.A., Wallace, M.B., Gill, K.R., Tong, Z., Burdick, M.D., Yang, Z., Strieter, R.M., Hoffman, R.M., *et al.* (2009). CXCL12/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 125, 1027-1037.
- Meert, A.P., Paesmans, M., Martin, B., Delmotte, P., Berghmans, T., Verdebout, J.M., Lafitte, J.J., Mascaux, C., and Sculier, J.P. (2002). The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *British journal of cancer* 87, 694-701.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Manes, S., and Martinez, A.C. (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annual review of immunology* 19, 397-421.
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., and Davidson, N.E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 357, 2666-2676.
- Mirandola, L., Chiriva-Internati, M., Montagna, D., Locatelli, F., Zecca, M., Ranzani, M., Basile, A., Locati, M., Cobos, E., Kast, W.M., *et al.* (2012). Notch1 regulates chemotaxis and proliferation by controlling the CC-chemokine receptors 5 and 9 in T cell acute lymphoblastic leukaemia. *The Journal of pathology* 226, 713-722.
- Mizushima, T., Yagi, H., Takemoto, E., Shibata-Koyama, M., Isoda, Y., Iida, S., Masuda, K., Satoh, M., and Kato, K. (2011). Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 16, 1071-1080.
- Montecarlo, F.S., and Charo, I.F. (1997). The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. Receptor activation by a pseudo-tethered ligand. *The Journal of biological chemistry* 272, 23186-23190.
- Moriguchi, M., Hissong, B.D., Gadina, M., Yamaoka, K., Tiffany, H.L., Murphy, P.M., Candotti, F., and O'Shea, J.J. (2005). CXCL12 signaling is independent of Jak2 and Jak3. *The Journal of biological chemistry* 280, 17408-17414.
- Morschhauser, F., Illidge, T., Huglo, D., Martinelli, G., Paganelli, G., Zinzani, P.L., Rule, S., Liberati, A.M., Milpied, N., Hess, G., *et al.* (2007). Efficacy and safety of yttrium-90 ibritumomab tiuxetan in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma not appropriate for autologous stem-cell transplantation. *Blood* 110, 54-58.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., *et al.* (2008). Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 1789-1796.

- Myszka, D.G. (2000). Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. *Methods in enzymology* 323, 325-340.
- Nagata, S., Salvatore, G., and Pastan, I. (2003). DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *Journal of immunological methods* 280, 59-72.
- Ngo, H.T., Leleu, X., Lee, J., Jia, X., Melhem, M., Runnels, J., Moreau, A.S., Burwick, N., Azab, A.K., Roccaro, A., *et al.* (2008). SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 112, 150-158.
- Niall, H.D. (1973). Automated Edman degradation: the protein sequenator. *Methods in enzymology* 27, 942-1010.
- Nibbs, R.J., and Graham, G.J. (2013). Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nature reviews Immunology* 13, 815-829.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19-28.
- Niwa, R., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Shinkawa, T., Uchida, K., Nakamura, K., Matsushima, K., Ueda, R., Hanai, N., and Shitara, K. (2004). Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma. *Cancer research* 64, 2127-2133.
- Panjideh, H., Muller, G., Koch, M., Wilde, F., Scheu, S., Moldenhauer, G., and Lipp, M. (2014). Immunotherapy of B-cell non-Hodgkin lymphoma by targeting the chemokine receptor CXCR5 in a preclinical mouse model. *International journal of cancer Journal international du cancer* 135, 2623-2632.
- Pecorelli, S. (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 105, 103-104.
- Peggs, K.S., Quezada, S.A., Chambers, C.A., Korman, A.J., and Allison, J.P. (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *The Journal of experimental medicine* 206, 1717-1725.
- Prado, G.N., Suetomi, K., Shumate, D., Maxwell, C., Ravindran, A., Rajarathnam, K., and Navarro, J. (2007). Chemokine signaling specificity: essential role for the N-terminal domain of chemokine receptors. *Biochemistry* 46, 8961-8968.
- Qiuping, Z., Jei, X., Youxin, J., Wei, J., Chun, L., Jin, W., Qun, W., Yan, L., Chunsong, H., Mingzhen, Y., *et al.* (2004). CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in CD4⁺ T cells from patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of lvin activation. *Cancer research* 64, 7579-7587.
- Qiuping, Z., Qun, L., Chunsong, H., Xiaolian, Z., Baojun, H., Mingzhen, Y., Chengming, L., Jinshen, H., Qingping, G., Kejian, Z., *et al.* (2003). Selectively increased expression and functions of chemokine receptor CCR9 on CD4⁺ T cells from patients with T-cell lineage acute lymphocytic leukemia. *Cancer research* 63, 6469-6477.
- Racila, E., Link, B.K., Weng, W.K., Witzig, T.E., Ansell, S., Maurer, M.J., Huang, J., Dahle, C., Halwani, A., Levy, R., *et al.* (2008). A polymorphism in the complement component C1qA correlates with prolonged response following rituximab therapy of follicular lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 6697-6703.

- Rajagopalan, L., and Rajarathnam, K. (2004). Ligand selectivity and affinity of chemokine receptor CXCR1. Role of N-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 279, 30000-30008.
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., and Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Experimental cell research* 317, 575-589.
- Rech, A.J., and Vonderheide, R.H. (2009). Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1174, 99-106.
- Reff, M.E., Hariharan, K., and Braslawsky, G. (2002). Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 9, 152-166.
- Rehm, A., Anagnostopoulos, I., Gerlach, K., Broemer, M., Scheiderei, C., Johrens, K., Hubler, M., Hetzer, R., Stein, H., Lipp, M., *et al.* (2009). Identification of a chemokine receptor profile characteristic for mediastinal large B-cell lymphoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 125, 2367-2374.
- Reichert, J.M., and Dhimolea, E. (2012). The future of antibodies as cancer drugs. *Drug discovery today* 17, 954-963.
- Rettig, W.J., and Old, L.J. (1989). Immunogenetics of human cell surface differentiation. *Annual review of immunology* 7, 481-511.
- Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology* 18, 217-242.
- Rubin, J.B. (2009). Chemokine signaling in cancer: one hump or two? *Seminars in cancer biology* 19, 116-122.
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., and Johnson, D.H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* 355, 2542-2550.
- Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadie, M., Simonetti, A., Lutz, J.M., *et al.* (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 116, 3724-3734.
- Sanz-Rodriguez, F., Hidalgo, A., and Teixido, J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97, 346-351.
- Sarvaiya, P.J., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian, P., and Lesniak, M.S. (2013). Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* 4, 2171-2185.
- Scholten, D.J., Canals, M., Maussang, D., Roumen, L., Smit, M.J., Wijtmans, M., de Graaf, C., Vischer, H.F., and Leurs, R. (2012). Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *British journal of pharmacology* 165, 1617-1643.
- Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature reviews Cancer* 12, 278-287.
- Shan, D., Ledbetter, J.A., and Press, O.W. (1998). Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 91, 1644-1652.
- Sharma, P.K., Singh, R., Novakovic, K.R., Eaton, J.W., Grizzle, W.E., and Singh, S. (2010). CCR9 mediates PI3K/AKT-dependent antiapoptotic signals in prostate cancer cells and inhibition of CCR9-CCL25 interaction enhances the cytotoxic effects of etoposide. *International journal of cancer Journal international du cancer* 127, 2020-2030.

- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Sievers, E.L., Appelbaum, F.R., Spielberger, R.T., Forman, S.J., Flowers, D., Smith, F.O., Shannon-Dorcy, K., Berger, M.S., and Bernstein, I.D. (1999). Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood* 93, 3678-3684.
- Sircar, A., Kim, E.T., and Gray, J.J. (2009). RosettaAntibody: antibody variable region homology modeling server. *Nucleic acids research* 37, W474-479.
- Somovilla-Crespo, B., Alfonso-Perez, M., Cuesta-Mateos, C., Carballo-de Dios, C., Beltran, A.E., Terron, F., Perez-Villar, J.J., Gamallo-Amat, C., Perez-Chacon, G., Fernandez-Ruiz, E., *et al.* (2013). Anti-CCR7 therapy exerts a potent anti-tumor activity in a xenograft model of human mantle cell lymphoma. *Journal of hematology & oncology* 6, 89.
- Suzuki, Y., Rahman, M., and Mitsuya, H. (2001). Diverse transcriptional response of CD4+ T cells to stromal cell-derived factor SDF-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4+ T cells. *J Immunol* 167, 3064-3073.
- Szpakowska, M., Fievez, V., Arumugan, K., van Nuland, N., Schmit, J.C., and Chevigne, A. (2012). Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochemical pharmacology* 84, 1366-1380.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., *et al.* (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.
- Tan, P., Mitchell, D.A., Buss, T.N., Holmes, M.A., Anasetti, C., and Foote, J. (2002). "Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. *J Immunol* 169, 1119-1125.
- Tavor, S., Petit, I., Porozov, S., Avigdor, A., Dar, A., Leider-Trejo, L., Shemtov, N., Deutsch, V., Naparstek, E., Nagler, A., *et al.* (2004). CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer research* 64, 2817-2824.
- Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 2927-2931.
- Tiscornia, G., Singer, O., and Verma, I.M. (2006). Production and purification of lentiviral vectors. *Nature protocols* 1, 241-245.
- Trabuco, L.G., Lise, S., Petsalaki, E., and Russell, R.B. (2012). PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic acids research* 40, W423-427.
- Van Cutsem, E., Kohne, C.H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.R., Makhson, A., D'Haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., *et al.* (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 360, 1408-1417.
- Van Regenmortel, M.H.V. (1996). Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods* 9, 465-472.
- Vega, B., Munoz, L.M., Holgado, B.L., Lucas, P., Rodriguez-Frade, J.M., Calle, A., Rodriguez-Fernandez, J.L., Lechuga, L.M., Rodriguez, J.F., Gutierrez-Gallego, R., *et*

- al.* (2011). Technical advance: Surface plasmon resonance-based analysis of CXCL12 binding using immobilized lentiviral particles. *Journal of leukocyte biology* 90, 399-408.
- Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2006). Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12). *Journal of molecular biology* 359, 1400-1409.
- Vergunst, C.E., Gerlag, D.M., Lopatinskaya, L., Klareskog, L., Smith, M.D., van den Bosch, F., Dinant, H.J., Lee, Y., Wyant, T., Jacobson, E.W., *et al.* (2008). Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis and rheumatism* 58, 1931-1939.
- Vicari, A.P., Figueroa, D.J., Hedrick, J.A., Foster, J.S., Singh, K.P., Menon, S., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Bacon, K.B., *et al.* (1997). TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7, 291-301.
- Vlahakis, S.R., Villasis-Keever, A., Gomez, T., Vanegas, M., Vlahakis, N., and Paya, C.V. (2002). G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J Immunol* 169, 5546-5554.
- Wang, J.F., Park, I.W., and Groopman, J.E. (2000a). Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 95, 2505-2513.
- Wang, S.Y., Veeramani, S., Racila, E., Cagley, J., Fritzinger, D.C., Vogel, C.W., St John, W., and Weiner, G.J. (2009). Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood* 114, 5322-5330.
- Wang, Z., Raifu, M., Howard, M., Smith, L., Hansen, D., Goldsby, R., and Ratner, D. (2000b). Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *Journal of immunological methods* 233, 167-177.
- Ward, S.G. (2006). T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends in immunology* 27, 80-87.
- Weiner, L.M., Belldegrun, A.S., Crawford, J., Tolcher, A.W., Lockbaum, P., Arends, R.H., Navale, L., Amado, R.G., Schwab, G., and Figlin, R.A. (2008). Dose and schedule study of panitumumab monotherapy in patients with advanced solid malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 502-508.
- Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 10, 317-327.
- Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., and Forster, R. (2007). CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6347-6352.
- Weng, W.K., and Levy, R. (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 3940-3947.

- Winter, G., and Harris, W.J. (1993). Humanized antibodies. *Immunology today* 14, 243-246.
- Witzig, T.E., Gordon, L.I., Cabanillas, F., Czuczman, M.S., Emmanouilides, C., Joyce, R., Pohlman, B.L., Bartlett, N.L., Wiseman, G.A., Padre, N., *et al.* (2002). Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20, 2453-2463.
- Witzig, T.E., Molina, A., Gordon, L.I., Emmanouilides, C., Schilder, R.J., Flinn, I.W., Darif, M., Macklis, R., Vo, K., and Wiseman, G.A. (2007). Long-term responses in patients with recurring or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma treated with yttrium 90 ibritumomab tiuxetan. *Cancer* 109, 1804-1810.
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071.
- Wu, W., Doan, N., Said, J., Karunasiri, D., and Pullarkat, S.T. (2014). Strong expression of chemokine receptor CCR9 in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma strongly correlates with gastrointestinal involvement. *Human pathology* 45, 1451-1458.
- Wurbel, M.A., Malissen, M., Guy-Grand, D., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Richelme, M., Carrier, A., and Malissen, B. (2001). Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* 98, 2626-2632.
- Wurbel, M.A., Philippe, J.M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M.G., Malissen, M., Jordan, B.R., *et al.* (2000). The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *European journal of immunology* 30, 262-271.
- Youn, B.S., Kim, C.H., Smith, F.O., and Broxmeyer, H.E. (1999). TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* 94, 2533-2536.
- Younes, A., Bartlett, N.L., Leonard, J.P., Kennedy, D.A., Lynch, C.M., Sievers, E.L., and Forero-Torres, A. (2010). Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *The New England journal of medicine* 363, 1812-1821.
- Yu, C.R., Peden, K.W., Zaitseva, M.B., Golding, H., and Farber, J.M. (2000). CCR9A and CCR9B: two receptors for the chemokine CCL25/TECK/Ck beta-15 that differ in their sensitivities to ligand. *J Immunol* 164, 1293-1305.
- Zaballos, A., Gutierrez, J., Varona, R., Ardavin, C., and Marquez, G. (1999). Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J Immunol* 162, 5671-5675.
- Zabel, B.A., Agace, W.W., Campbell, J.J., Heath, H.M., Parent, D., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., *et al.* (1999). Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *The Journal of experimental medicine* 190, 1241-1256.

- Zalevsky, J., Leung, I.W., Karki, S., Chu, S.Y., Zhukovsky, E.A., Desjarlais, J.R., Carmichael, D.F., and Lawrence, C.E. (2009). The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. *Blood* 113, 3735-3743.
- Zhang, X.F., Wang, J.F., Matczak, E., Proper, J.A., and Groopman, J.E. (2001). Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1α-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 97, 3342-3348.
- Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature reviews Immunology* 9, 729-740.
- Zlotnik, A. (2004). Chemokines in neoplastic progression. *Seminars in cancer biology* 14, 181-185.
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., and Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nature reviews Immunology* 11, 597-606.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

Anexo



Publicaciones derivadas de este trabajo:

1. Vela M, Aris M, Llorente M, Garcia-Sanz JA, Kremer L.
Chemokine Receptor-Specific Antibodies in Cancer Immunotherapy: Achievements and Challenges.
Frontiers in Immunology. 2015; 6:12.
2. Chamorro S, Vela M, Franco-Villanueva A, Carramolino L, Gutiérrez J, Gómez L, Lozano M, Salvador B, García-Gallo M, Martínez-A C, Kremer L.
Antitumor effects of a monoclonal antibody to human CCR9 in leukemia cell xenografts.
MAbs. 2014; 6:1000-12.

Solicitud de patente derivada de este trabajo:

1. Chamorro S., Vela M., Franco A., Carramolino L., Martínez Alonso C., García Sanz J.A., Kremer L.
Antibodies against CCR9 and applications thereof
Nº solicitud patente europea: EP13382469.8
Año de presentación: 2013